

**Das murine *Bptf/Fac1*-Gen:
Struktur, Expression und Funktion während der frühen
Postimplantationsentwicklung**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

genehmigte

Dissertation

von Tobias Goller
aus Hildesheim

1. Referent: Prof. Dr. Hans-Henning Arnold

2. Referent: Prof. Dr. Martin Korte

eingereicht am: 07.02.2007

mündliche Prüfung (Disputation) am: 12.06.2007

Druckjahr 2007

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor dieser Arbeit, in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

Tagungsbeitrag

Goller T., Suresh Kumar R., Ruiz P., Arnold H.H., Vauti F.:

The mouse ortholog of the human FAC1 gene: Molecular and functional analysis of a novel gene trap mouse line. (Poster) 17th International Mouse Genome Conference, Braunschweig (2003).

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	<i>Bptf/Fac1</i> – das Säuger-Ortholog zum <i>Drosophila Nurf301</i> -Gen	3
2.1.1	Expression und Funktion der humanen Isoform FAC1	3
2.1.2	Funktion der Isoform BPTF	7
2.1.3	Chromatin-Struktur und Nukleosomen-Remodelling	8
2.1.4	Das <i>Drosophila Nurf301</i> -Gen und der NURF-Komplex	10
2.2	Die Embryonalentwicklung der Maus	11
2.2.1	Kurzer Überblick über die Embryonalentwicklung der Maus	11
2.2.2	Molekulare Grundlagen der Peri- und Postimplantationsentwicklung	18
2.3	Mutation des murinen <i>Bptf/Fac1</i> -Gens durch einen Gene Trap-Vektor	23
2.4	Ziele der Dissertation	25
3	Material	26
3.1	Laborgeräte und Verbrauchsmaterial	26
3.2	Chemikalien	27
3.3	Lösungen, Stammlösungen, Puffer und Medien	28
3.4	Enzyme und Antikörper	41
3.5	Kits	42
3.6	Primer	42
3.7	Vektoren	45
3.8	Plasmide und RNA-Sonden für die <i>In situ</i> -Hybridisierung	46
3.9	Bakterienstämme	47
3.10	Computerprogramme	47
3.11	Molekularbiologische Datenbanken	48
3.12	Histologische Atlanten und Datenbanken	48
3.13	Mausstämme, Maushaltung und Bestimmung der Embryonalstadien	49
4	Methoden	51
4.1	Molekularbiologische Methoden	51

4.1.1	Genotypisierung von Mäusen und Embryonen	51
4.1.1.1	Genotypisierung durch radioaktive Hybridisierung restriktionsverdauter genomischer DNA	51
4.1.1.2	PCR-Genotypisierung	53
4.1.2	Expressionsanalyse durch Northern-Hybridisierung	53
4.1.3	Expressionsanalyse durch RT-PCR (Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion)	54
4.1.4	Sequenzierung von PCR-, RT-PCR-Produkten und Plasmiden	55
4.1.5	Herstellung von Plasmiden und RNA-Hybridisierungssonden (Riboproben)	56
4.2	Zellbiologische und histologische Methoden	58
4.2.1	Präparation von Embryonen und Organen	58
4.2.2	Expressionsanalyse durch LacZ-Färbung von Embryonen, Organen und Vibratomschnitten	59
4.2.3	Analyse der Bildung von Nervenfasern durch den immun- chemischen Nachweis von Neurofilament-Protein	60
4.2.4	Anatomische Analyse durch Hämatoxylin/Eosin-Färbung	61
4.2.5	Expressions- und Phänotypanalyse durch <i>In situ</i> -Hybridisierung	62
4.2.5.1	Whole mount <i>In situ</i> -Hybridisierung	63
4.2.5.2	<i>In situ</i> -Hybridisierungen auf Paraffinschnitten	64
5	Ergebnisse	65
5.1	Struktur des murinen <i>Bptf/Fac1</i> -Gens	65
5.2	Die funktionellen Domänen des murinen <i>Bptf/Fac1</i> -Proteins sind hoch konserviert	71
5.3	Charakterisierung der Integration des Gene Trap-Vektors pPT1βgeo in den <i>Bptf/Fac1</i> -Locus und Genotypisierung der Mauslinie A012C04	73
5.4	Expression von <i>Bptf/Fac1</i> während der Embryonalentwicklung	79
5.5	Expression von <i>Bptf/Fac1</i> während der postnatalen Gehirnentwicklung und in anderen adulten Organen	89
5.6	Letalität von <i>Bptf/Fac1</i> ^{GT/GT} -Embryonen	92
5.7	Morphologische und anatomische Defekte während der frühen Post- implantationsentwicklung in <i>Bptf/Fac1</i> ^{GT/GT} -Embryonen	94

6	Diskussion	110
6.1	Die Struktur des <i>Bptf/Fac1</i> -Gens deutet auf eine genregulatorische Funktion hin	110
6.2	Die funktionellen Domänen von Bptf/Fac1 sind über Artengrenzen hinweg hoch konserviert	112
6.3	<i>Bptf/Fac1</i> wird während der Postimplantationsentwicklung und während der postnatalen Hirnentwicklung exprimiert	113
6.4	Die Gene Trap-Mutation und die Mauslinie A012C04 ermöglichen eine Analyse der Funktion des <i>Bptf/Fac1</i> -Genproduktes	114
6.5	Die Gene Trap-Mutation macht eine wichtige Funktion von Bptf/Fac1 in der frühen Postimplantationsentwicklung deutlich	115
6.6	Bptf/Fac1 ist notwendig für die Bildung des ektoplazentalen Kegels	116
6.7	Die Expression, aber nicht die Funktion von Bptf/Fac1 ist abhängig vom genetischen Hintergrund	118
6.8	Ein Ausblick – Weitere Möglichkeiten zur Analyse der Funktion von Bptf/Fac1	119
7	Literaturverzeichnis	121
8	Anhang	149
8.1	Die murine <i>Bptf/Fac1</i> -cDNA-Sequenz	149
8.2	Der <i>Bptf/Fac1</i> -Locus im Mausgenom auf Chromosom 11	152
8.3	Die murine Bptf/Fac1-Aminosäuresequenz	153
8.4	Vergleich der Aminosäuresequenzen der funktionellen Domänen der Bptf/Fac1-Proteine von Maus, Ratte, Mensch und Fruchtfliege	154
8.5	Ergebnisse der Sequenzierung des 5'RACE-Produktes aus dem ES-Zellklon A012C04	157
9	Abkürzungen	159

1 Zusammenfassung

Das Gen für den Transkriptionsfaktor Bptf/Fac1 – das Säuger-Ortholog des *Drosophila* Gens *Nurf301* – kodiert für zwei Proteinisoformen. Die kurze Isoform FAC1 wird beim Menschen während der Neuronalentwicklung, aber auch während neurodegenerativer Prozesse exprimiert. Die lange Isoform Bptf ist ein Histon-modifizierendes Bromodomain-Protein, das ein Bestandteil des NURF-Komplexes ist, der bei der Modifizierung der Chromatinstruktur an der Umbildung der Nukleosomen beteiligt ist.

Hier beschreibe ich die Genstruktur und die Expression des murinen *Bptf/Fac1*-Gens sowie den embryonal letalen Phänotyp einer Mausmutante, die durch Gene Trap-Mutagenese erzeugt wurde. Auch in der Maus bildet das aus 31 Exons bestehende Gen die lange Isoform *Bptf* und die kurze Isoform *Fac1*. *Fac1* ist identisch mit der 5'-Sequenz von *Bptf*. Beide Isoformen enthalten mehrere DNA-Bindungsdomänen (PHD/LAP-Zinkfingermotiv, DDT-Domäne) sowie Signalsequenzen für den Kernimport und -export, aber nur *Bptf* besitzt eine Bromodomäne, die an der Acetylierung der Histone während der Nukleosomenumbildung beteiligt ist. Verglichen mit den orthologen Sequenzen von Ratte und Mensch sind alle bekannten Domänen der murinen *Bptf* und *Fac1*-Proteine hochkonserviert. Während der frühen Postimplantationsentwicklung um E5.5 ist zunächst nur die Isoform *Fac1* im ektoplazentalen Kegel und im Epiblast exprimiert. Die Isoform *Bptf* wird erst ab E6.5 exprimiert. Die Expression von *Bptf/Fac1* ist entwicklungsspezifisch reguliert. Während der Embryonalentwicklung weitet sich das Expressionsmuster – insbesondere in neuronalen Geweben – immer weiter aus, wohingegen die Expression während der postnatalen Entwicklung in den meisten Geweben immer weiter abnimmt. Als deutliche Expressionsdomänen verbleiben im adulten Stadium nur der Hippocampus und die granuläre Zellschicht im Cerebellum. Eine Gene Trap-Vektor-Integration in Intron 1 des *Bptf/Fac1*-Gens verursacht in homozygot mutanten Embryonen einen Defekt während der frühen Postimplantationsentwicklung. Nach der Implantation in den Uterus entwickeln diese Embryonen keinen ausreichenden ektoplazentalen Kegel, der einen für die Versorgung des Embryos notwendigen Kontakt zum maternalen Decidualgewebe herstellen kann, weshalb diese Embryonen um E9.5 absterben. Die homozygot mutanten Embryonen sind

insgesamt in ihrer Entwicklung retardiert. Neben der Entwicklung der extraembryonalen Gewebe sind auch die Proliferation und die Differenzierung des Epiblasts (embryonales Ektoderm) durch die Mutation beeinflusst. So erfolgt die Ausbildung von anterioren und posterioren Organisatorstrukturen wie dem anterioren visceralen Endoderm und dem Primitivstreifen sowie die Anlage des Knotens mit einer Verzögerung um bis zu zwei Tage. Der Phänotyp dieser Gene Trap-Mutation macht somit eine essentielle Funktion von Bptf/Fac1 beim Ablauf der frühen Postimplantationsentwicklung deutlich.

2 Einleitung

Orthologe des murinen Gens *Bptf/Fac1* (Bromo domain plant homeodomain transcription factor / Fetal ALZ50-reactive clone 1) wurden bisher vorwiegend im Menschen und in der Fruchtfliege untersucht und mit der Kontrolle der Genexpression durch Modifizierung der Chromatinstruktur in Verbindung gebracht. In dieser Arbeit werden die Struktur des murinen *Bptf/Fac1*-Gens sowie seine Expression dargestellt. Darüber hinaus werden mit Hilfe einer Mutation im *Bptf/Fac1*-Locus der Maus die Auswirkungen des Funktionsverlustes des *Bptf/Fac1*-Genproduktes während der frühen Postimplantationsentwicklung untersucht.

2.1 *Bptf/Fac1* – das Säuger-Ortholog zum *Drosophila Nurf301*-Gen

Bei Säugetieren stellt das *Bptf/Fac1*-Gen das Ortholog zum Gen *Nurf301* von *Drosophila melanogaster* dar. *Nurf301* kodiert für eine Untereinheit des Chromatin-Remodelling-Komplexes NURF (nucleosome remodelling factor) (Xiao *et al.*, 2001). Beim Menschen findet man die beiden Isoformen BPTF (Bromo domain plant homeodomain transcription factor) und FAC1 (Fetal ALZ50-reactive clone 1; Falz). Die menschliche BPTF-Isoform besteht aus 2781 Aminosäuren. Die Isoform FAC1 ist mit 801 Aminosäuren deutlich kleiner und identisch mit dem vollständigen Aminoterminus der Isoform BPTF. In bisherigen Studien wurden die Funktionen von BPTF und FAC1 separat voneinander untersucht (Bowser *et al.*, 1995; Jordan-Sciutto *et al.*, 1999 I; Barak *et al.*, 2003).

2.1.1 Expression und Funktion der humanen Isoform FAC1

Das humane FAC1-Protein wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers ALZ50 in den pathologischen amyloiden Plaques von Alzheimer-Patienten entdeckt (Bowser *et al.*, 1995). Der Antikörper Alz50 bindet spezifisch die hyperphosphorylierte Form des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau, die charakteristisch für amyloide Plaques ist

(Ksiezak-Reding *et al.*, 1995). In diesem Fall erkennt ALZ50 ein Epitop, das gemeinsam von FAC1 und hyperphosphoryliertem Tau gebildet wird (Jicha *et al.*, 1997).

Aufgrund der Entdeckung von FAC1 in den pathologischen Strukturen von Alzheimer-Patienten wurde die Expression von FAC1 während der Entwicklung des menschlichen zentralen Nervensystems und während neurodegenerativer Prozesse untersucht. Bei beiden Vorgängen ändert sich die subzelluläre Lokalisierung des FAC1-Proteins (Bowser *et al.*, 1995). Die Veränderung der subzellulären Lokalisation scheint somit die Funktion von FAC1 während der Neuronalentwicklung und während neurodegenerativer Prozesse zu regulieren.

Während der frühen Gehirnentwicklung findet man FAC1 im Nukleus, dem Soma und den Neuriten von undifferenzierten Neuronen der Grundplatte (engl.: *subplate*). Später während der Ausbildung des Cortex ist es im Soma und in den auswachsenden Neuriten der noch wenig ausdifferenzierten Neuronen der äußeren corticalen Schicht vorhanden, wohingegen es in den reifen Neuronen der inneren corticalen Schicht nur in einigen, nicht näher definierten Bereichen innerhalb des Nukleus lokalisiert ist. Im adulten Gehirn ist die Expression von FAC1 fast ausschließlich auf den Nukleus neocorticaler Neurone begrenzt, wo sie in punktförmigen, nicht näher beschriebenen Domänen außerhalb der Nukleoli zu finden ist.

Während der frühen Entwicklung des Rückenmarks ist FAC1 im Nukleus und Soma von Motorneuronen vorhanden. Im adulten Rückenmark jedoch ist FAC1 nur schwach im Soma von Alpha-Motorneuronen der Lamina IX der grauen Substanz exprimiert.

Bei Morbus Alzheimer wurde eine verstärkte Bildung von FAC1 in den dendritischen Komponenten von diffusen und neuritischen Plaques (Schoonover *et al.*, 1996) und ebenso in aktivierten Mikroglia (Bowser *et al.*, 1998) gezeigt. In einigen Fällen von Morbus Alzheimer wurde FAC1 auch in den geschwollenen Dendriten hippocampaler Pyramidalzellen nachgewiesen (Schoonover *et al.*, 1996).

Desweiteren wurde im lumbalen Rückenmark von Patienten mit ALS (amyotrophe laterale Sklerose) eine Hochregulierung von FAC1 in den verbliebenen Alpha-Motorneuronen gefunden (Mu *et al.*, 1997). Auch konnte gezeigt werden, daß eine Läsion des entorhinalen Cortex zur Expression von FAC1 in der molekularen Schicht des Gyrus dentatus führt (Styren *et al.*, 1997).

In PC12-Zellen konnte ein positiver Einfluß von NGF (Nervenwachstumsfaktor) auf die Expression von FAC1 und dessen subzellulärer Verteilung sowie das Auswachsen von Neuriten gezeigt werden (Rhodes *et al.*, 2003).

FAC1 wird zur Klasse der PHD/LAP (Plant homeodomain/Leukemia associated protein)-Zinkfingerproteine gezählt. Zu dieser Proteinfamilie zählen viele Transkriptionsfaktoren, z.B. Hox1.A, Hat3.1 und das *Drosophila* Trithoraxprotein Brahma sowie Faktoren der Polycomb-Gruppe, die an der Reorganisierung von Chromatin beteiligt sind (Aasland *et al.*, 1995).

Die FAC1-cDNA kodiert für 810 Aminosäuren. Das FAC1-Protein enthält neben einem nukleären Lokalisationssignal (NLS) und einem nukleären Exportsignal (NES) mehrere DNA-Bindungsdomänen, u.a. ein Zinkfinger-Motiv vom PHD/LAP-Typ (Plant homeodomain/Leukemia-associated protein; Aasland *et al.*, 1995; Bienz, 2006). Dieser Typ von Zinkfingermotiv beinhaltet eine Cys4-His-Cys3-Komplexierung zweier Zink-Atome. Eine benachbarte DDT-Domäne (DNA-binding and determination of transcription) wird ebenfalls als DNA-Bindungsmotiv betrachtet. DDT-Domänen sind in verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Chromosom-Remodelling-Faktoren vorhanden (Doerks *et al.*, 2001). Am N-Terminus sind eine saure und eine basische Domäne vorhanden, die möglicherweise für Protein-Protein-Interaktionen von Bedeutung sind. Außerdem gibt es zwei putative Retinoblastoma-Susceptibility-Bindungsmotive und ein PEST-Motiv, das eine Signalsequenz für die Proteindegradation in Proteasomen ist (Rechsteiner und Rogers, 1996).

FAC1 ist ein Transkriptionsfaktor (Zhu *et al.*, 1996), der mit einer spezifischen DNA-Sequenz, dem FAC1-Bindungselement (FBE) interagiert. Die Consensus-Sequenz des FBE lautet CACAACAC. Ein FBE wurde in den Promotorregionen von verschiedenen Genen gefunden. Einige dieser Gene werden mit neurodegenerativen

Prozessen in Verbindung gebracht, z.B. *Presenilin 1* (*PS1*, *PSEN1*), *Amyloid Precursor Protein* (*APP*), *Cu/Zn-Superoxid-Dismutase* (*SOD*) und *Dopamin-Rezeptor D2* (*D2R*). Mutationen in den Genen für Presenilin 1 und Amyloid Precursor Protein sind in Fällen erblicher Alzheimer-Erkrankung und Mutationen im Gen für Cu/Zn-Superoxid-Dismutase sind bei amyotropher lateraler Sklerose gezeigt worden. Vermutlich wirkt FAC1 durch Bindung an das FBE repressorisch auf die Expression dieser Gene (Jordan-Sciutto *et al.*, 1999 I). Wegen des vermuteten regulatorischen Einflusses auf diese Gene könnte FAC1 eine Funktion bei der neuronalen Entwicklung und Degeneration innehaben. Die Kernsequenz AACAA des FBE ist auch in den Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren enthalten, z.B. in der E-Box, an welche z.B. die Transkriptionsfaktoren E2A und Myogenin binden (Jacobs *et al.*, 1993; Voronova *et al.*, 1994; Weintraub, 1993), sowie in der Bindungsstelle für Forkhead-Transkriptionsfaktoren (Overdier *et al.*, 1994; Kaufmann *et al.*, 1994). Möglicherweise kompetitiert FAC1 mit diesen Faktoren um die Bindung an regulatorische Regionen bestimmter Gene (Jordan-Sciutto *et al.*, 1999 I).

Computergestützte Promotoranalysen und ChIP-Analysen zeigten Bindungsstellen für FAC1 in Promotorregionen von einigen Genen (z.B. *Sap30*), deren Transkription durch mSin3A reguliert werden (Dannenberg *et al.*, 2005). mSin3A ist eine Komponente des Corepressor-Komplexes mSin3A/HDAC, der eine Histon-Deacetylase (HDAC)-Funktion aufweist (Schreiber-Agus und DePinho, 1998; Ayer, 1999; Knoepfer und Eisenman, 1999; Silverstein und Ekwall, 2004). Es wurde eine Interaktion von mSin3A mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren (p53, Ikaros, REST, E2F4) gezeigt, welche eine Funktion in verschiedenen Signalwegen und bei unterschiedlichen zellulären Prozessen (Zellzyklus-Kontrolle, DNA-Replikation, DNA-Reperatur, Apoptose, Chromatin-Modifizierung) haben (Murphy *et al.*, 1999; Koipally *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Rayman *et al.*, 2002; Dannenberg *et al.*, 2005).

In Zellkulturstudien konnte gezeigt werden, daß die DNA-Bindungsaktivität von FAC1 durch Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten verstärkt werden kann (Jordan-Sciutto *et al.*, 1999 II). Es wurden Consensus-Sequenzen für die Phosphorylierung durch Proteinkinase C und Caseinkinase II gefunden. Phosphorylierte Serin- bzw. Threonin-Reste wurden im Bereich der DNA-

Bindungsstellen sowie des NLS und NES ermittelt. Die Aktivität von FAC1 dürfte deshalb von äußeren Stimuli abhängen.

Bei einem Yeast-Two-Hybrid-Screen konnte eine Interaktion von FAC1 mit dem myc-assoziierten Zinkfingerprotein ZF87/MAZ gezeigt werden (Jordan-Sciutto *et al.*, 2000). Dabei erkennt FAC1 eine Zinkfinger-Domäne und eine Prolin/Alanin-reiche Domäne von ZF87/MAZ. Die Bindungsdomäne für ZF87/MAZ wurde im Bereich der Kern-Import-Export-Domäne des FAC1-Proteins lokalisiert. Es wurde dargestellt, daß ZF87/MAZ an GC-reiche Promotoren bindet. FAC1 und ZF87/MAZ colokalisieren in den für Morbus Alzheimer charakteristischen pathologischen Strukturen.

Ebenfalls bei einem Yeast-Two-Hybrid-Screen wurde eine Interaktion von Fac1 mit Keap1 (Kelch-like ECH-associated Protein) festgestellt (Strachan *et al.*, 2004). Keap1 reguliert einen Signalweg für die Antwort auf oxidativen Stress durch eine Interaktion mit Nrf-Transkriptionsfaktoren. Als Antwort auf oxidativen Stress entlässt Keap1 das vorher gebundene Nrf2 in den Nukleus, wo dieses an Promotoren mit einem Antioxidant Response Element (ARE) bindet, z.B. in den Genen für Glutathion-S-Transferase und NAD(P)H-Quinon-Reduktase. Die Bindung wird durch die PEST-Domäne von FAC1 vermittelt. Wahrscheinlich kompetitieren FAC1 und Nrf2 um die Bindung an die Kelch-Wiederholungen (DGR-Domäne) von Keap1, bei denen es sich wahrscheinlich um Actin-Bindungsstellen handelt. Da Keap1 gleichzeitig FAC1 und F-Actin binden kann, könnte es die subzelluläre Lokalisation von FAC1 über eine Verknüpfung mit dem Mikrofilament-System kontrollieren.

2.1.2 Funktion der Isoform BPTF

Bei Datenbankrecherchen nach neuen Bromodomän-Transkriptionsfaktoren wurde eine mit 2781 Aminosäuren beträchtlich längere Isoform von FAC1 gefunden, die BPTF (Bromo domain plant homeodomain transcription factor) genannt wurde (Jones *et al.*, 2000). In Datenbanken findet man orthologe cDNA-Sequenzen von BPTF von Mensch (Accession Numbers AB032251, AY282495) und Ratte (Accession Number XM_221050). Die Sequenz der Ratte wurde anhand des Genanalyse-Programmes GNOMON vorhergesagt und ist bisher experimentell nicht bestätigt worden. Beim

Menschen ist der 5'Bereich der *BPTF*-cDNA komplett identisch mit der vollständigen *FAC1*-cDNA (2643 bp). Im zusätzlichen 3'-Bereich der *BPTF*-cDNA gibt es zwei zusätzliche PHD/LAP-Zinkfinger motive, eine EGF-ähnliche Domäne sowie eine Bromodomäne. Eine Bromodomäne ist eine 110 Aminosäuren lange Sequenz, die mit acetylierten Lysin-Resten interagiert. Diese Domäne findet man in einigen Chromatin-assoziierten Proteinen (Haynes *et al.*, 1992; Zeng und Zhou, 2002). Es wird davon ausgegangen, daß die Bromodomäne durch die Acetylierung von Histonen an der Regulierung der Chromatin-Organisation beteiligt ist.

In Zellkultur- und Peptidbindungsstudien wurde gezeigt, daß BPTF durch mindestens ein C-terminales PHD-Zinkfinger motiv an den trimethylierten Lysin-Rest H3K4me3 von Histon H3 bindet (Wysocka *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006). H3K4me3 markiert den Transkriptionsstartpunkt aller aktiven Gene (Santos-Rosa *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2004; Bernstein *et al.*, 2005; Pokholok *et al.*, 2005). An der Methylierung von H3K4 ist das WD40-Protein WDR5 beteiligt. WDR5 kontrolliert so beispielsweise die Expression von *HoxC8*. Ein Funktionsverlust von Bptf in *Xenopus*-Embryonen durch Injektion von *Bptf*-Morpholinos (Oligonukleotiden) in eine Blastomere des 2-Zellstadiums führt zu einem Phänotyp, der dem *WDR5*-Phänotyp (Wysocka *et al.*, 2005) bezüglich der Posteriorisierung der *HoxC8*-Expression sowie der Defekte in der Achsen-, Darm- und Blutbildung ähnelt (Wysocka *et al.*, 2006). Wahrscheinlich vermitteln das PHD-Zinkfinger motiv und die benachbarte Bromodomäne gemeinsam die Nukleosomen-Bindung, wie es bereits für andere Faktoren gezeigt wurde (Ragvin *et al.*, 2004; Zhou und Grummt, 2005).

Das humane *BPTF*-Gen ist auf Chromosom 17 in einer Region (17q23) lokalisiert, die mit chromosomalen Aberrationen in Neuroblastomen und rapidem Krankheitsfortschritt in Verbindung gebracht wird (Lastowska *et al.*, 2001).

2.1.3 Chromatin-Struktur und Nukleosomen-Remodelling

Die Modifizierung der Chromatinstruktur ist ein wichtiger regulatorischer Mechanismus zur Kontrolle der Genexpression bei Entwicklungsvorgängen. Zwei Klassen von Proteinen sind an der Veränderung der Chromatinstruktur beteiligt. Die

einen acetylieren bzw. deacetylieren die Histone, die anderen sind für den Zusammenbau oder die Positionierung der Nukleosomen zuständig (Chromatin-Remodelling-Komplexe). Nach phylogenetischer Einteilung gibt es zwei Gruppen von Chromatin-Remodelling-Komplexen: Die SWI2/SNF2-Komplexe (bei *Drosophila* Brahma) und die ISWI (Imitation Switch)-Komplexe. Beide besitzen eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität, die für eine Gleitbewegung der Nukleosomen am DNA-Strang (Nukleosomen-Sliding) notwendig ist (Varga-Weisz und Becker, 1998; Kingston und Narlikar, 1999; Kornberg und Lorch, 1999; Peterson und Workman, 2000). Die ATP-abhängige Gleitbewegung wird durch eine Interaktion mit spezifischen Aminosäureresten in der N-terminalen Schwanzdomäne von Histon H4 des Nukleosoms bewirkt (Hamiche *et al.*, 2001; Schwanbeck *et al.*, 2004). In *Drosophila* wurden bisher drei ISWI-Komplexe gefunden. ACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodelling factor) und CHRAC (chromatin accessibility complex) bewirken eine geordnete Aneinanderreihung der Nukleosomen, NURF (nucleosome remodelling factor) verändert diese periodische Nukleosomenfolge wieder, ohne dabei den Oktamer-Komplex des Nukleosoms umzubauen (Tsukiyama und Wu, 1995; Tsukiyama *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 1997; Varga-Weisz *et al.*, 1997; Hamiche *et al.*, 1999).

Beim Menschen wurden bisher die zwei ISWI-Proteine hSNF2H und hSNF2L entdeckt, die eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität besitzen (Aihara *et al.*, 1998). hSNF2H ist in den für die geordnete Aneinanderreihung der Nukleosomen verantwortlichen Komplexen RSF (remodelling and spacing factor), WCRF (Williams syndrome transcription factor-related chromatin remodelling factor) und HuCHRAC (human chromatin accessibility complex) vorhanden (LeRoy *et al.*, 1998; LeRoy *et al.*, 2000; Bochar *et al.*, 2000; Poot *et al.*, 2000). hSNF2L ist Bestandteil des menschlichen NURF-Komplexes (Barak *et al.*, 2003). Während der Entwicklung des Nervensystems der Maus zeigen Snf2H und Snf2L unterschiedliche Expressionsmuster. Snf2H ist am stärksten in proliferierenden Zellpopulationen (z.B. im Neocortex, im Cerebellum und im olfaktorischen Epithel) exprimiert, Snf2L hingegen ist in ausdifferenzierten (postmitotischen) Neuronen im postnatalen und adulten Stadium hochreguliert. Besonders in den Purkinje-Zellen und in der granulären Zellschicht im Cerebellum sowie im Hippocampus konnte während der postnatalen Entwicklung eine deutliche Zunahme der Expression von Snf2L gezeigt

werden (Lazarro und Picketts, 2001). Demnach ist Snf2H wahrscheinlich bei der räumlich geordneten Positionierung der Nukleosomen nach der Replikation involviert, Snf2L ist möglicherweise an der Veränderung der Nukleosomenanordnung im Zusammenhang mit spezifischen Genregulationsvorgängen beteiligt.

2.1.4 Das *Drosophila* Nurf301-Gen und der NURF-Komplex

Die Proteinsequenz des humanen BPTF ist zu etwa 35% identisch mit dem *Drosophila*-Protein Nurf301. Das Nurf301-Protein von *Drosophila melanogaster* ist ein 301 kDa Protein, das die größte Untereinheit des Chromatin-Remodelling-Komplexes NURF (nucleosome remodelling factor) ist (Xiao *et al.*, 2001). Weitere Untereinheiten des *Drosophila* NURF-Komplexes sind die ISWI-ATPase Nurf140, die anorganische Pyrophosphatase Nurf38 und Nurf55, das auch in weiteren Histon-assoziierten Komplexen vorkommt (Martinez-Balbas *et al.*, 1998). Der NURF-Komplex dürfte die Transkription von Genen regulieren, indem er die Position von Nukleosomen im Bereich von Promotoren steuert und mit sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren interagiert. Diese Interaktion wird von Nurf301 vermittelt. Nurf301 ist strukturell entfernt verwandt mit der ACF1-Untereinheit des Chromatin-Remodelling-Komplexes ACF und enthält neben einem Acf1-Motiv einen PHD-Zinkfinger, eine Bromodomäne und eine HMGA/HMGI(Y)-ähnliche Domäne. Die HMGA/HMGI(Y)-ähnliche Domäne von Nurf301 bewirkt vermutlich das Gleiten des Nukleosoms. Es konnte nachgewiesen werden, daß der NURF-Komplex bei der Veränderung der Nukleosomenstruktur mit dem GAGA-Faktor wie auch mit dem Progesteron-Rezeptor interagiert und so die Aktivierung des Gens *fushi tarazu* bzw. vom MMTV-Promotor abhängiger Gene ermöglicht (Okada und Hirose, 1998; Di Croce *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2001). Mit Hilfe von *Nurf301*-Mutanten wurde gezeigt, daß Nurf301 für die Induktion von Hitzeschock-Genen (*hsp 70* und *hsp 26*) und für die Expression homeotischer Gene der Bithorax-Gruppe (*Ultrabithorax Ubx* und *Engrailed En*) benötigt wird und außerdem bei der larvalen Hämatopoese beteiligt ist, indem es möglicherweise als negativer Regulator innerhalb des JAK/STAT-Signalweges wirkt. Desweiteren verursachen Mutationen von *Nurf301* eine Verkürzung des männlichen X-Chromosoms (Badenhorst *et al.*, 2002).

Der NURF-Komplex des Nematoden *Caenorhabditis elegans* beinhaltet zumindest die Komponenten Isw-1 und Nurf-1, das Ortholog zu Nurf301 von *Drosophila*. Das Gen *nurf-1* bildet fünf Transkripte, von denen jedes ein Protein kodiert, das homologe Sequenzbereiche zu Nurf301 aufweist. Jedoch sind alle fünf Nurf-1-Isoformen kürzer als Nurf301 und enthalten jeweils nur einen Teil der bekannten Proteindomänen. Nurf-1a ähnelt dem N-Terminus von Nurf301 und besitzt eine HMGY/I-Domäne, eine DDT-Domäne und ein PHD-Zinkfingermotiv. Nurf-1b ist homolog zum mittleren Bereich von Nurf301. Nurf-1c, Nurf-1d und Nurf-1e entsprechen dem C-Terminus von Nurf301 und beinhalten jeweils zwei PHD-Zinkfinger motive und eine Bromodomäne. Deletionsmutationen und RNAi-Inaktivierung von *Isw-1* und *Nurf-1a* unterdrücken den Multivulva-Phänotyp (Muv), der durch Mutationen in den *synMuv*-Genen und eine Überaktivierung des Ras-Signalweges verursacht wird (Andersen *et al.*, 2006).

Bei Säugern besteht der NURF-Komplex aus BPTF, der ATPase-Untereinheit SNF2L und den Retinoblastoma-assoziierten Proteinen RbAP(p46) und RbAP(p48). RbAP(p46) und RbAP(p48) sind Orthologe von *Drosophila* Nurf55 (Barak *et al.*, 2003). Studien in der Maus zeigen im adulten Gehirn eine Colokalisation von Bptf und Snf2L in den Purkinje-Zellen und in der granulären Zellschicht des Cerebellums sowie im Hippocampus (Barak *et al.*, 2003). Durch die Bindung von BPTF an den trimethylierten Lysin-Rest H3K4me3 von Histon H3 wird die Stabilität des NURF-Komplexes erhöht (Wysocka *et al.*, 2006). Der humane NURF-Komplex reguliert die Gene *Engrailed 1* (*EN1*) und *Engrailed 2* (*EN2*) und potenziert den Auswuchs von Neuriten in der Zellkultur (Barak *et al.*, 2003).

2.2 Die Embryonalentwicklung der Maus

2.2.1 Kurzer Überblick über die Embryonalentwicklung der Maus

Die Embryonalentwicklung der Maus dauert je nach Mausstamm 19 bis 21 Tage. Sie beginnt mit der Fertilisation, der Befruchtung des Eizelle durch das Spermium, und der Bildung der Zygote in der Ampulla des Ovidukts. Es folgen mehrere Furchungsteilungen, wodurch zuerst ein 2-zelliger Embryo und dann folgend ein 4-, 8-, 16-Zeller und schließlich ein kompakter Zellhaufen, die Morula entstehen.

Während dieser ersten Entwicklungsphase, in der er im Ovidukt in Richtung des Uterus wandert, nimmt die Gesamtgröße des Embryos nicht zu. Bis zum frühen 8-Zellstadium sind alle Zellen (Blastomeren) des Embryos noch äqui- und totipotent. Bei der Kompaktierung zur Morula legen die Blastomeren dann aber schon apikale und basale Plasmamembrandomänen Domänen fest (Polarisation).

Nach 3 bis 3 ½ Tagen entsteht durch die Ansammlung von Flüssigkeit und Bildung einer Höhle (Blastocoel) im Inneren des Embryos die Blastozyste, bei der erstmals zwei verschiedene Zellpopulationen zu unterscheiden sind. Den inneren Bereich der Blastozyste bildet die Innere Zellmasse (ICM), die aus totipotenten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) besteht. Das äußere Epithel des Embryos ist das Trophektoderm. Der an die Innere Zellmasse angrenzende Teil des Trophektoderms wird als polares Trophektoderm bezeichnet, den das Blastocoel umgebenden Teil nennt man murales Trophektoderm. Im folgenden durchbricht die Blastozyste die Zona pellucida, eine Membran, die den Embryo während der Präimplantationsentwicklung umgeben hat.

Nach 4 bis 4 ½ Tagen hat die geschlüpfte Blastozyste das Lumen des Uterus erreicht, implantiert in den Uterus und leitet die Postimplantationsentwicklung ein. Dabei adhäriert der gegenüber der ICM liegende abembryonale Pol der Blastozyste an der antimesometrialen Seite des Uterusepithels. Die Anheftung der Blastozyste stimuliert bei der Decidualreaktion das Stroma des Uterus zur Bildung eines schwammförmigen Deciduumgewebes, innerhalb dessen sich der Embryo schließlich in einer Krypte befindet. Vom polaren Trophektoderm abstammende Zellen des Embryos wandern phagozytotisch in das Deciduumgewebe ein und stellen so einen ersten Kontakt zwischen embryonalem und maternalem Gewebe her.

Zu Beginn der Implantation des Embryos in den Uterus um E4.5 durchlaufen die Zellen des muralen Trophektoderms bis zu 1000 DNA-Replikationszyklen ohne aber eine Zellteilung zu vollziehen (Zybina, 1970; Zybina und Grishchenko, 1970; Zybina und Zybina, 1985; Bower, 1987; Varmuza *et al.*, 1988). Durch diese Endoreduplikation entstehen polytäre Chromosomen enthaltende, terminal differenzierte primäre Trophoblast-Riesenzellen (Barlow und Sherman, 1972; Barlow und Sherman, 1974; Snow und Ansell, 1974; Hoffman und Wooding, 1993; Rossant

und Cross, 2001). Diese dringen durch Phagozytose in das Uterus-Epithel ein und bilden kleine Blutgefäße, die Kontakt zum vaskulären System des Deciduums herstellen (Potts, 1968; Bevilacqua und Abrahamsohn, 1988). Im Gegensatz dazu stellt das polare Trophektoderm zunächst eine Population proliferierender, diploider Zellen dar (Gardner und Johnson, 1972; Gardner *et al.*, 1973). Aus dem polaren Trophektoderm heraus bildet sich das extraembryonale Ektoderm und aus diesem der ekto-plazentale Kegel (Copp, 1979). Darüber hinaus gehen später aus dem extraembryonalen Ektoderm mehrkernige Syncytiotrophoblast-Zellen hervor, welche die innere Labyrinthschicht der Plazenta bilden (Cross, 2000; Cross *et al.*, 2002). Der ekto-plazentale Kegel (engl.: *ectoplacental cone*) enthält Vorläuferzellen sowohl für sekundäre Trophoblast-Riesenzellen als auch für den Spongiotrophoblast (Carney *et al.*, 1993). Die inneren Zellen des ekto-plazentalen Kegels werden zu Zellen des Spongiotrophoblasten, welcher die mittlere Schicht der Plazenta und außerdem sekundäre Riesenzellen bildet (Copp, 1979; Cross *et al.*, 1994; Rossant, 1995; Zybina und Zybina, 1996; Cross, 2000). Die proximalen Zellen des ekto-plazentalen Kegels vollziehen genau wie vorher die Zellen des muralen Trophektoderms bis zu tausendmal eine Endoreduplikation und differenzieren zu polyploiden Riesenzellen (McAuley *et al.*, 1998; Ohgane *et al.*, 1998), die später an der Peripherie der Plazenta liegen. Bei der Differenzierung von proliferierenden Trophoblast-Zellen zu invasiven Trophoblast-Riesenzellen kommt es zu Veränderungen in der Organisation des Cytoskeletts (Parast *et al.*, 2001) und in der Expression von Cadherinen und Connexinen (Grummer *et al.*, 1996; Reuss *et al.*, 1996; Winterhager *et al.*, 2000), weshalb sich ihr Adhäsionsverhalten (Cross *et al.*, 1995) und ihre Motilität (Sutherland *et al.*, 1988; Gonzales *et al.*, 1996 I; Gonzales *et al.*, 1996 II) ändern. Sekundäre Trophoblast-Riesenzellen exprimieren Hormone und Wachstumsfaktoren wie z.B. plazentales Lactogen, Proliferine und Proliferin-verwandte Proteine (Hall und Talamantes, 1984; Linzer *et al.*, 1985; Linzer und Nathans, 1985; Wilder und Linzer, 1986; Colosi *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1988; Ogren und Talamantes, 1988; Deb *et al.*, 1991; Faria *et al.*, 1991; Southard und Talamantes, 1991; Yamaguchi *et al.*, 1992; Yamaguchi *et al.*, 1994; Hamlin *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1997 I; Lin *et al.*, 1997 II; Toft und Linzer, 1999), die für die Bildung und Reifung der Plazenta und deren Vaskularisierung benötigt werden. Desweiteren vermitteln Trophoblast-Riesenzellen die Interaktion mit den maternalen Deciduum-Zellen (Bevilacqua *et al.*, 1985; Bevilacqua und Abrahamsohn, 1989), sie sezernieren Metalloproteasen

(Rinkenberger *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1997; Teesalu *et al.*, 1999) und bilden Blutgefäße, die sich mit den maternalen Kapillaren verbinden (Welsh und Enders, 1987; Bevilacqua und Abrahamsohn, 1988).

Während der Implantation finden auch erste Differenzierungsprozesse in der Inneren Zellmasse statt. Die direkt an das Blastocoel grenzende Schicht der ICM bildet das primitive Endoderm (Hypoblast) (Lu *et al.*, 2001). Der verbleibende Kern der ICM ist der Ursprung des primitiven Ektoderms (embryonales Ektoderm; Epiblast) dessen Zellen allein zu den ektodermalen, mesodermalen und endodermalen sowie Keimzellen des späteren Fötus beitragen und außerdem das Amnion sowie die mesodermalen Komponenten der visceralen Fruchtblasenmembran und der Plazenta hervorbringen. Das primitive Endoderm differenziert in das parietale Endoderm und in das den Epiblast umgebende viscerele Endoderm, beides Bestandteile der späteren Fruchtblase (Hogan und Tilly, 1981; Bielinska *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2001). Das parietale Endoderm sezerniert Bestandteile zum Aufbau der Reichert-Membran, die zwischen dem parietalen Endoderm und dem muralen Trophektoderm angelegt wird und den Embryo vom Deciduum abgrenzt. Im visceralen Endoderm exprimiert und für dessen Differenzierung und Bildung von Bedeutung sind die Transkriptionsfaktoren GATA-6 (Morrisey *et al.*, 1998; Koutsourakis *et al.*, 1999), GATA-4 (Soudais *et al.*, 1995), HNF-4 (Chen *et al.*, 1994), vHNF-1 (Barbacci *et al.*, 1999; Coffinier *et al.*, 1999) und EVX1 (Spyropoulos und Capecchi, 1994) sowie weitere Faktoren wie Laminin (Smyth *et al.*, 1999), AFP (Dziadek, 1978), BMP (Coucovanis und Martin, 1999), Apolipoprotein B (Farese *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1995; Herz und Farese, 1999; Terasawa *et al.*, 1999), IHH (Maye *et al.*, 2000), GRB2 (Cheng *et al.*, 1998), LRP (Herz *et al.*, 1992; Herz *et al.*, 1993), und Megalin (Gueth-Hallonet *et al.*, 1994; Willnow *et al.*, 1996). Das viscerele Endoderm wirkt regulatorisch auf die Entwicklung von embryonalem und extraembryonalem Ektoderm und ist z.B. an der Bildung der anterior-posterioren Achse sowie an der Kavitation des Embryos beteiligt (Farese und Herz, 1998; Bielinska *et al.*, 1999; Coucovanis und Martin, 1995; Coucovanis und Martin, 1999).

Im Laufe der frühen Postimplantationsphase werden im Embryo drei Höhlen gebildet, die amniotische, die exocoelomische und die ektoplazentale Höhle. Zu Beginn der Kavitation um E5.0 formiert sich durch Apoptose der proamniotische Kanal innerhalb

des Epiblasts und des extraembryonalen Ektoderms (Coucouvanis und Martin, 1995; Brison und Schultz, 1997; Pampfer und Donnay, 1999). Die Zellen des Epiblast, welche den proamniotischen Kanal umgeben, differenzieren in säulenförmige Pseudo-Schicht-Epithelzellen.

Im Verlauf der frühen Postimplantationsentwicklung bildet der Embryo drei Körperachsen. Zuerst wird mit Beginn der Implantation eine dorsoventrale (proximodistale), dann ab ca. E6.0 eine anterior-posteriore und schließlich ab E7.5 eine Links-Rechts-Achse angelegt. Diese drei embryonalen Achsen korrelieren mit den drei Achsen des Uterushorns, der mesometrial-antimesometrialen Achse, der Links-Rechts-Achse und der Ovidukt-Cervix-Achse.

Eine bedeutende Phase in der Embryonalentwicklung der höheren Tiere ist die Gastrulation, bei der die drei Keimschichten des Embryos, nämlich Ektoderm, Mesoderm und Endoderm entsprechend des Körperbauplans angelegt werden. Bei der Maus beginnt die Gastrulation um E6.5 mit der Bildung des Primitivstreifens, der seinen Ursprung im posterioren Teil des Eizylinders an der Grenze zwischen dem embryonalem und dem extraembryonalem Abschnitt hat. Im Bereich des Primitivstreifens verliert der Epiblast seine Kontinuität, Zellen lösen sich voneinander, wandern zwischen Epiblast und visceralem Endoderm ein und bilden die intermediäre Mesodermischiicht. Das Auftreten des Primitivstreifens sowie die Determinierung des anterioren visceralen Endoderms lassen erstmals die anterior-posteriore Orientierung des Embryos sichtbar werden. Im Verlaufe der Gastrulation verlängert sich der Primitivstreifen von seinem Ursprung an der embryonal-extraembryonalen Grenze aus in Richtung der distalen Spitze des Eizylinders. Vorläuferzellen für die drei Keimschichten gehen aus einem Teil der Zellen im anterioren Bereich des Primitivstreifens hervor. An der anterioren Spitze des Primitivstreifens entsteht bei Voranschreiten der Gastrulation eine Organisatorstruktur mit äquivalentem Potential zur dorsalen Blastoporenlippe in der Amphibienentwicklung und zum Hensenschen Knoten in der Entwicklung der Vögel. Dieser Organisator verändert sich während der Gastrulation. Die als Knoten (engl.: *node*) bezeichnete Endstufe ist eine Einstülpung direkt an der distalen Spitze des Embryos und besteht aus einer dorsalen und ventralen Schicht. Die ventrale Schicht (Notochordplatte) besteht aus Zellen mit je einem beweglichen Cilium. Aus ihr bildet

sich das Notochord. Am Knoten liegende Zellen bilden desweiteren das axiale Mesoderm, das cardiogene Mesoderm und das Prechordalplatten-Mesoderm sowie das definitive Endoderm und die Bodenplattenzellen des Neuralrohrs.

Ab E7.5 sind im posterioren Bereich des Embryos die primordialen Keimzellen nachweisbar. Zwischen E8.0 und E8.5 formen sich Kopfstrukturen und die Neuronalentwicklung beginnt mit der Bildung der Neuralfalte gefolgt von der Bildung der Hirnblasen und des Neuralrohres. Ebenfalls zwischen E8.0 und E8.5 werden die ersten der schließlich 65 Somitenpaare angelegt und die Entwicklung von Kiemenbögen und Herz beginnt. Um E8.75 dreht sich der gesamte Embryo, so daß es zu einer Invertierung der Keimschichten kommt. Das Ektoderm, das vorher innen lag, befindet sich jetzt außen. Beim Endoderm verhält es sich umgekehrt. Ab E9.5 bilden sich die Vorderextremitäten, ab E10 die Hinterextremitäten. Die Bildung des Auges beginnt um E10.5, die Entwicklung der Niere und der Sexualorgane um E11, eine Geschlechtsbestimmung ist ab E12.5 möglich. Die Knorpelbildung setzt ab E12.75 ein.

Die Plazenta der Maus besteht sowohl aus maternalem als auch aus embryonalem Gewebe. Der embryonale Teil der Plazenta wird vom Trophoblast gebildet, der aus dem ans Deciduumgewebe anliegenden Spongiotrophoblast und der darunter liegenden Labyrinthschicht besteht. Die meisten Spongiotrophoblastzellen sind polyploide sekundäre Riesenzellen, wohingegen die Labyrinthzellen vorwiegend diploid sind. Im Gegensatz zur menschlichen Plazenta sind die maternalen Blutgefäße in der Plazenta der Maus durchlässig, so daß maternale Blutzellen direkt mit dem embryonalen Trophoblasten in Kontakt kommen. Die maternalen Blutgefäße reichen in beide Schichten des Trophoblasten hinein. Neben der Versorgung des Embryos mit Nährstoffen, Metaboliten und Sauerstoff hat die Plazenta noch die Funktion der Synthese von Steroiden, Prostaglandinen und Polypeptiden, die für die maternale und embryonale Physiologie während der Schwangerschaft wichtig sind.

In Abbildung 1 ist die Abstammung der verschiedenen embryonalen und extraembryonalen Gewebe im frühen Postimplantationsembryo dargestellt. Abbildung 2 zeigt schematisch die Struktur von Embryonen der Stadien E4.5 bis E8.5.

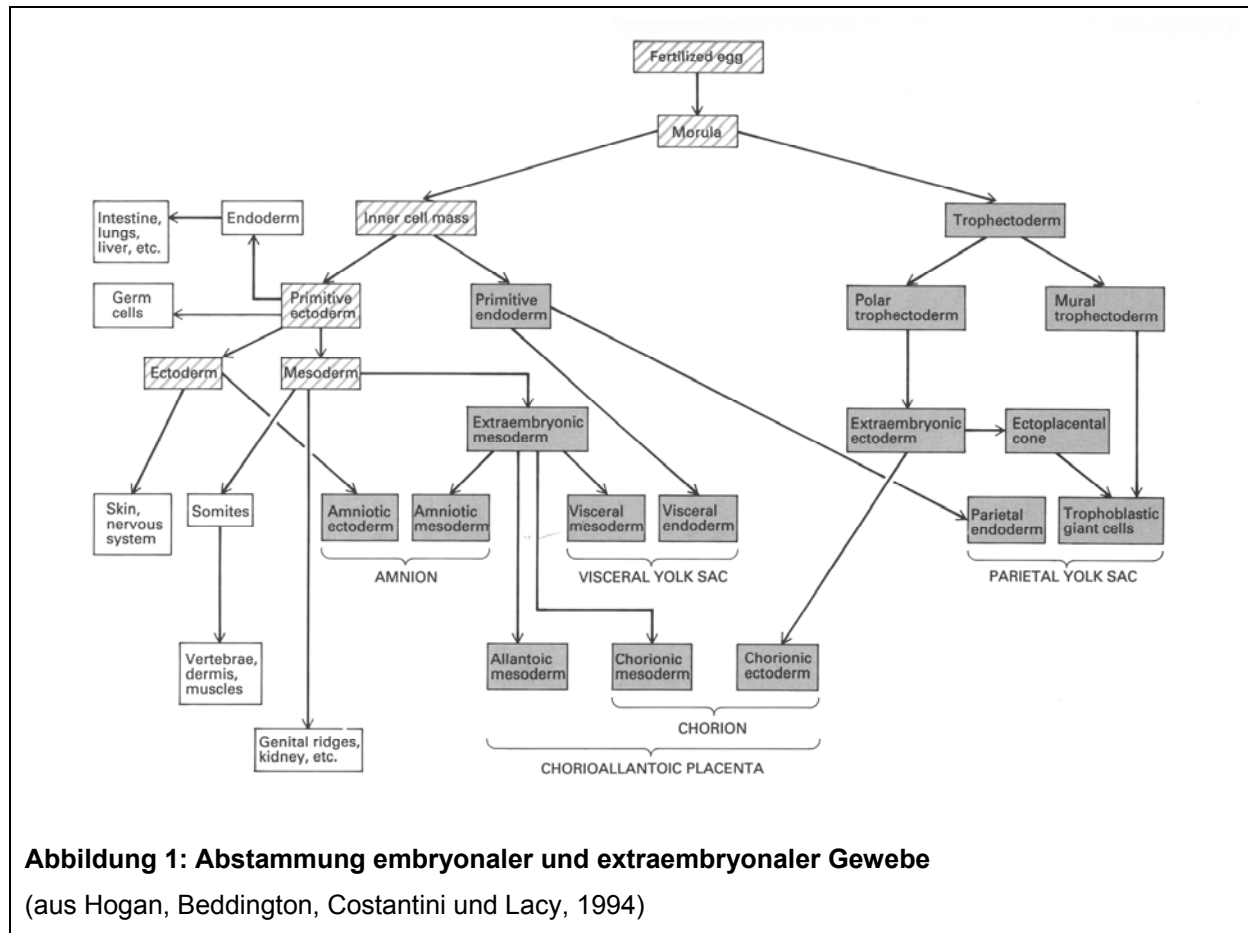


Abbildung 1: Abstammung embryonaler und extraembryonaler Gewebe

(aus Hogan, Beddington, Costantini und Lacy, 1994)

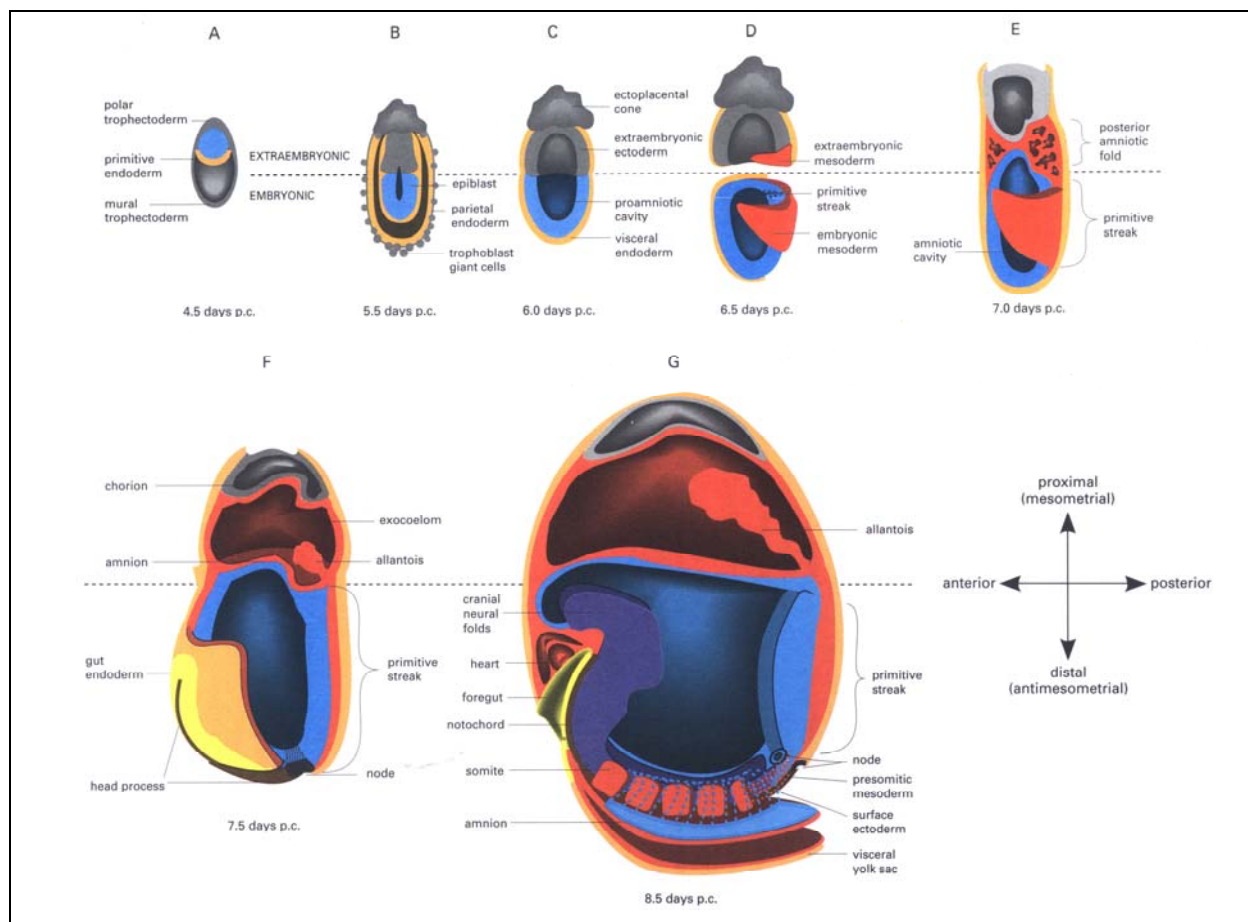


Abbildung 2: Darstellung der frühen Postimplantationsentwicklung von E4.5 bis E8.5

A E4.5, **B** E5.5, **C** E6.0, **D** E6.5, **E** E7.0, **F** E7.5, **G** E8.5; blau: Epiblast und davon abgeleitete Gewebe, gelb: Darmendoderm und davon abgeleitete Strukturen, orange: Hypoblast (primitives Endoderm) und davon abgeleitete Gewebe, rot: Primitivstreifen und Gewebe mesodermalen Ursprungs, schwarz: Trophektoderm und davon abgeleitete Gewebe
(aus Hogan, Beddington, Costantini und Lacy, 1994)

2.2.2 Molekulare Grundlagen der Peri- und Postimplantationsentwicklung

Die frühe Postimplantation der Maus ist gekennzeichnet durch hohe Proliferationsraten im Epiblast, aber auch im extraembryonalen Ektoderm, wodurch der Embryo eine konische Form erhält und deshalb als Eizylinder bezeichnet wird. Die Proliferation im polaren Trophektoderm und später im extraembryonalen Ektoderm beruht auf Trophoblast-Stammzellen (TS-Zellen), die im Embryo zwischen dem Blastozysten- und dem Gastrulationsstadium im an die ICM grenzenden Teil des polaren Trophektoderms bzw. nach der Implantation im an den Epiblast grenzenden Bereich des extraembryonalen Ektoderms zu finden sind (Tanaka *et al.*, 1998; Rossant, 2001; Uy *et al.*, 2002). Die Proliferation der TS-Zellen wird reguliert durch Signale aus der ICM bzw. dem Epiblast. Experimentell wurde gezeigt, daß das polare Trophektoderm bei Abwesenheit des Epiblast nicht proliferiert und stattdessen zu polyploiden Riesenzellen differenziert (Gardner und Johnson, 1972; Gardner *et al.*, 1973; Ansell und Snow, 1975; Goldstein *et al.*, 1975).

Für die Aufrechterhaltung der TS-Zellpopulation ist die Bildung von Fgf4 während des Blastozystenstadiums in der ICM bzw. nach der Implantation im Epiblast (Niswander und Martin, 1992; Rappolee *et al.*, 1994; Feldman *et al.*, 1995; Rossant und Cross 2001) sowie die Expression des FGF-Rezeptors Fgfr2 in den TS-Zellen notwendig (Orr-Urtreger *et al.*, 1991; Arman *et al.*, 1998; Haffner-Krausz *et al.*, 1999). So bilden *Fgf4*- und *Fgfr2*-Nullmutanten zwar expandierte Blastozysten, aber nach der Implantation kommt es zu einer sofortigen Degeneration des Embryos (Feldman *et al.*, 1995; Arman *et al.*, 1998; Gotoh *et al.*, 2005). *In vitro* bilden diese Blastozysten zwar Riesenzellen, aber kein erkennbares extraembryonales Ektoderm, außerdem ist die ICM reduziert (Feldman *et al.*, 1995). Entfernt man Fgf4 aus TS-Zellkulturen, führt dieses zum Verlust TS-Zell-spezifischer molekularer Marker wie *Cdx2* und

Eomesodermin und zur Differenzierung der TS-Zellen zu Riesenzellen (Tanaka *et al.*, 1998; Goldin und Papaioannou, 2003).

Die Expression von *Fgf4* in der ICM wird aktiviert durch die Transkriptionsfaktoren Oct4 und Sox2 (Ambrosetti *et al.* 2000). Oct4 und Sox2 sind darüber hinaus essentielle Faktoren für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von ES-Zellen (Nichols *et al.* 1998; Niwa *et al.* 2000).

Cdx2 und Eomesodermin sowie Err β , Nodal und vHnf1 sind weitere essentielle Faktoren für die Bildung und Aufrechterhaltung einer TS-Zellpopulation im extraembryonalen Ektoderm (Abb. 3). *Cdx2* (Beck *et al.*, 1995) und *Eomesodermin* (Hancock *et al.*, 1999) sind im polaren Trophektoderm bzw. später genauso wie Err β (Pettersson *et al.*, 1996) im distalen Teil des extraembryonalen Ektoderms exprimiert, *Oct4* (Palmieri *et al.*, 1994) und *Nodal* sind in der ICM bzw. im Epiblast exprimiert und *vHnf1* (Barbacci *et al.*, 1999) ist im visceralen Endoderm exprimiert. Aus Blastozysten mit Nullmutationen für *Cdx2* (Rossant *et al.*, 2003) bzw. *Eomesodermin* (Russ *et al.*, 2000) können keine TS-Zellen gewonnen werden. Die Phänotypen der Nullmutationen von *Cdx2* (Chawengsaksophak *et al.*, 1997; Tamai *et al.*, 1999), Eomesodermin (Russ *et al.*, 2000), *vHnf1* (Barbacci *et al.*, 1999) sowie *Oct4* (Nichols *et al.* 1998) ähneln dem Phänotyp der *Fgf4*-Nullmutante. Err β wird anscheinend nicht zur Bildung, sondern zu einem etwas späteren Zeitpunkt zur Aufrechterhaltung der TS-Zellpopulation benötigt, da eine Nullmutation sowie die pharmakologische Inhibierung des Rezeptors durch Diethylstilbestrol die weitere Proliferation der TS-Zellen unterbinden und stattdessen die Differenzierung zu Riesenzellen bewirken, was zu einer Letalität um E9.0 führt (Luo *et al.*, 1997; Tremblay *et al.*, 2001). Nodal wird durch die beiden vom extraembryonalen Ektoderm gebildeten und in den Epiblast sezernierten Subtilisin-artigen Proprotein-Konvertasen Furin (Spc1) und Pace4 (Spc4) proteolytisch aktiviert (Beck *et al.*, 2002). Nodal ist sowohl direkt als auch indirekt über die positive Regulation der *Fgf4*-Expression an der Aufrechterhaltung der TS-Zellpopulation beteiligt (Guzman-Ayala *et al.*, 2004).

Bei der Differenzierung von TS-Zellen zu Trophoblast-Riesenzellen kommt es zu einer Herunterregulierung der Expression von *Id1* und *Id2* sowie zu einer Hochregulierung der Expression von *Hand1* (*Hxt*) (Cross *et al.*, 1995). Experimentell wurde gezeigt, daß eine Überexpression der Id-Faktoren die Differenzierung unterdrückt, wohingegen eine Überexpression von Hand1 die Differenzierung einleitet.

Hand1 sowie Mash2 sind basische Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren, die antagonistische Funktionen während der Determinierung von Trophoblastzellen haben (Scott *et al.*, 2000). Hand1 wird im ekto-plazentalen Kegel und in sekundären Riesenzellen exprimiert. Eine *Hand1*-Expression im extraembryonalen Ektoderm konnte bisher durch *In situ*-Hybridisierung nicht gezeigt werden (Cross *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 2000), obwohl dort in einem LacZ-Knock in-Ansatz ein Signal detektiert

wurde (Firulli *et al.*, 1998). Hand1 ist ein essentieller Faktor für die Bildung von Riesenzellen, da Nullmutationen des *Hand1*-Gens einen reduzierten ekto-plazentalen Kegel und eine Blockierung der Differenzierung zu Riesenzellen verursachen, wodurch der Phänotyp um E7.5 letal ist (Cross *et al.*, 1995; Riley *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 2000). *Mash2* ist vor der Implantation im polaren Trophektoderm, nach der Implantation im extraembryonalen Ektoderm und im ekto-plazentalen Kegel exprimiert (Guillemot *et al.*, 1994; Nakayama *et al.*, 1997). Die Bildung von Mash2 unterdrückt die Differenzierung zu sekundären Riesenzellen und ist wichtig für die Erhaltung der Spongiotrophoblast-Zellpopulation. Eine Deletion des *Mash2*-Gens hat eine erhöhte Anzahl von Riesenzellen auf Kosten eines Verlustes von Spongiotrophoblastzellen zur Folge, was zu einer Letalität um E10.5 führt (Guillemot *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1997). Das paternale *Mash2*-Allel ist bis E7.5 exprimiert, wird dann aber durch genomische Prägung (engl.: *genomic imprinting*) transkriptionell inaktiviert, so daß Embryonen mit zwei paternalen bzw. nur mit einem paternalem, aber keinem maternalem Allel einen ähnlichen Phänotyp wie *Mash2*-Nullmutanten aufweisen (Guillemot *et al.*, 1995; McLaughlin *et al.*, 1996). Da eine Expression von *Mash2* durch Hypoxie induziert werden kann, vermittelt dieser Faktor die Proliferation und Differenzierung von Trophoblastzellen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration (Genbacev *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2000). Als bHLH-Faktoren bilden Hand1 und Mash2 zur DNA-Bindung Heterodimere mit E-Faktoren (Voronova *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1992; Cross *et al.*, 1995; Hollenberg *et al.*, 1995). *In vitro* konnte gezeigt werden, daß Hand1 die Aktivität von Mash2 durch die Konkurrenz um E-Faktoren inhibiert (Stephan *et al.*, 2003). Außerdem dürfte die differentielle Expression von E-Faktoren die Funktionen von Hand1 und Mash2 beeinflussen. Neben der Regulierung von Mash2 ist Hand1 wahrscheinlich aber auch auf anderen Wegen an der Trophoblastentwicklung beteiligt.

Bisher wurden nur wenige zusätzliche Faktoren ermittelt, die an der Differenzierung des ekto-plazentalen Kegels beteiligt sind. Bei einer Nullmutation von *Ets2*, das in den diploiden Trophoblastzellen exprimiert wird, ist die Proliferation des ekto-plazentalen Kegels reduziert und seine Differenzierung blockiert, so daß die Embryonen um E8.5 absterben (Yamamoto *et al.*, 1998).

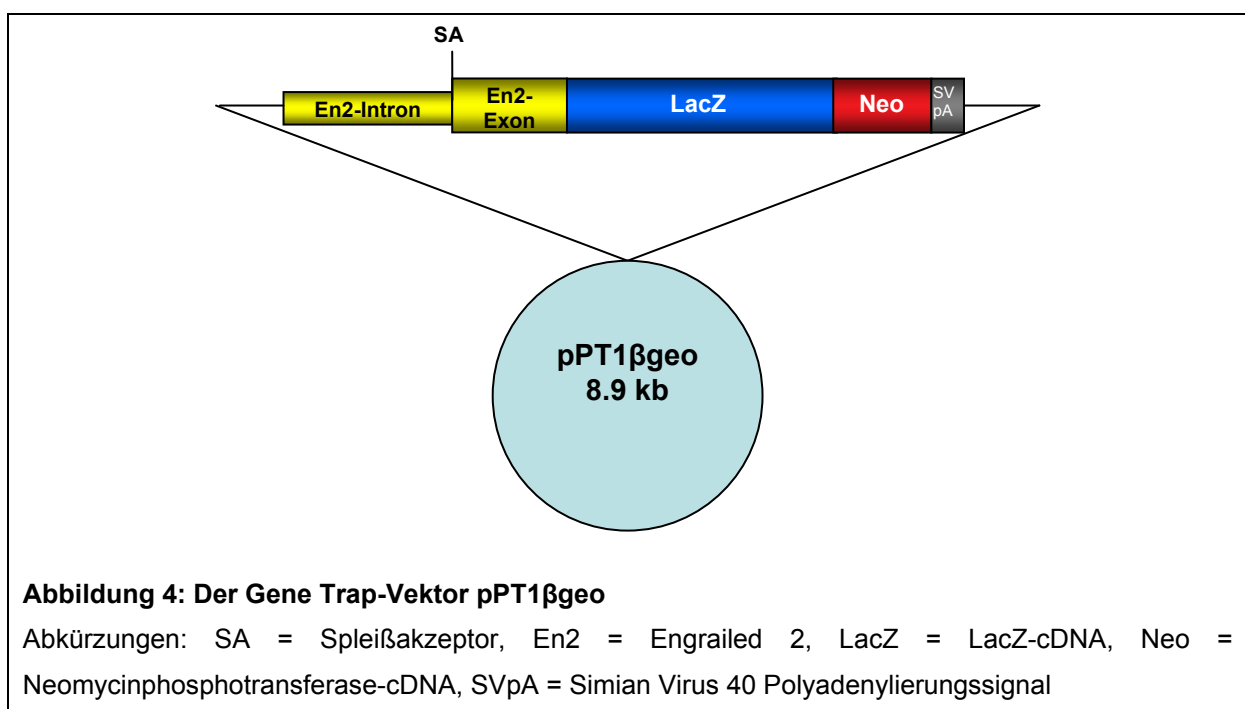
An der Determinierung von Syncytiotrophoblast-Zellen ist Gcm1 beteiligt (Anson-Cartwright *et al.*, 2000; Stecca *et al.*, 2002).

Nach der Implantation ist die proximodistale Achse des Embryos durch ein spezifisches Genexpressionsmuster gekennzeichnet (Beddington und Robertson, 1999; Lu *et al.*, 2001; Zernicka-Goetz, 2002). So sind *Brachyury*, *Nodal* und *Wnt3* im proximalen Epiblast exprimiert (Wilkinson *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 2001). Um E5.0 induziert im Epiblast gebildetes Nodal in Zellen des visceralen Endoderms an der distalen Spitze des Embryos die Expression des Transkriptionsfaktors Hex (Thomas *et al.*, 1998; Brennan *et al.*, 2001). Zwischen E5.5 und E6.0 wandern diese Zellen proximal an einer Seite des Embryos entlang und markieren mit der Bildung des anterioren visceralen Endoderms (AVE) den anterioren Pol des Embryos. Um E6.5 wandern Zellen des proximalen Epiblasts zur dem AVE gegenüberliegenden Seite und legen mit der Bildung des Primitivstreifens (PS) den posterioren Pol des Embryos fest. Durch diese Zellwanderungen wird die proximodistale Embryonalachse in eine anterior-posteriore Achse umgewandelt (Whitman, 2001; Norris *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2004; Srinivas *et al.*, 2004). Neben der Bildung des AVE ist Nodal auch an der Formierung des Primitivstreifens und des Mesoderms beteiligt (Thomas und Beddington, 1996; Thomas *et al.*, 1998; Beddington und Robertson, 1999; Brennan *et al.*, 2001; Rivera-Perez *et al.*, 2003). Zellen des AVE sezernieren Nodal - und Wnt-Antagonisten wie z.B. Cer1, Lefty1, und Dkk1 in den angrenzenden Bereich des Epiblasts und verleihen diesem eine anteriore Identität, indem sie den Einfluß von Nodal und Wnt sowie eine anteriore Ausbreitung des Mesoderms verhindern (Kimura *et al.*, 2000; Perea-Gomez *et al.*, 2001; Perea-Gomez *et al.*, 2002). Dadurch werden die Expressionsdomänen von *Nodal* und *Wnt3* auf die posteriore Seite des Embryos begrenzt (Beddington und Robertson, 1999; Lu *et al.*, 2001). Kürzlich wurde festgestellt, daß die Position des Primitivstreifens von der Lage der anterior-posterioren Achse abweichen kann (Perea-Gomez *et al.*, 2004).

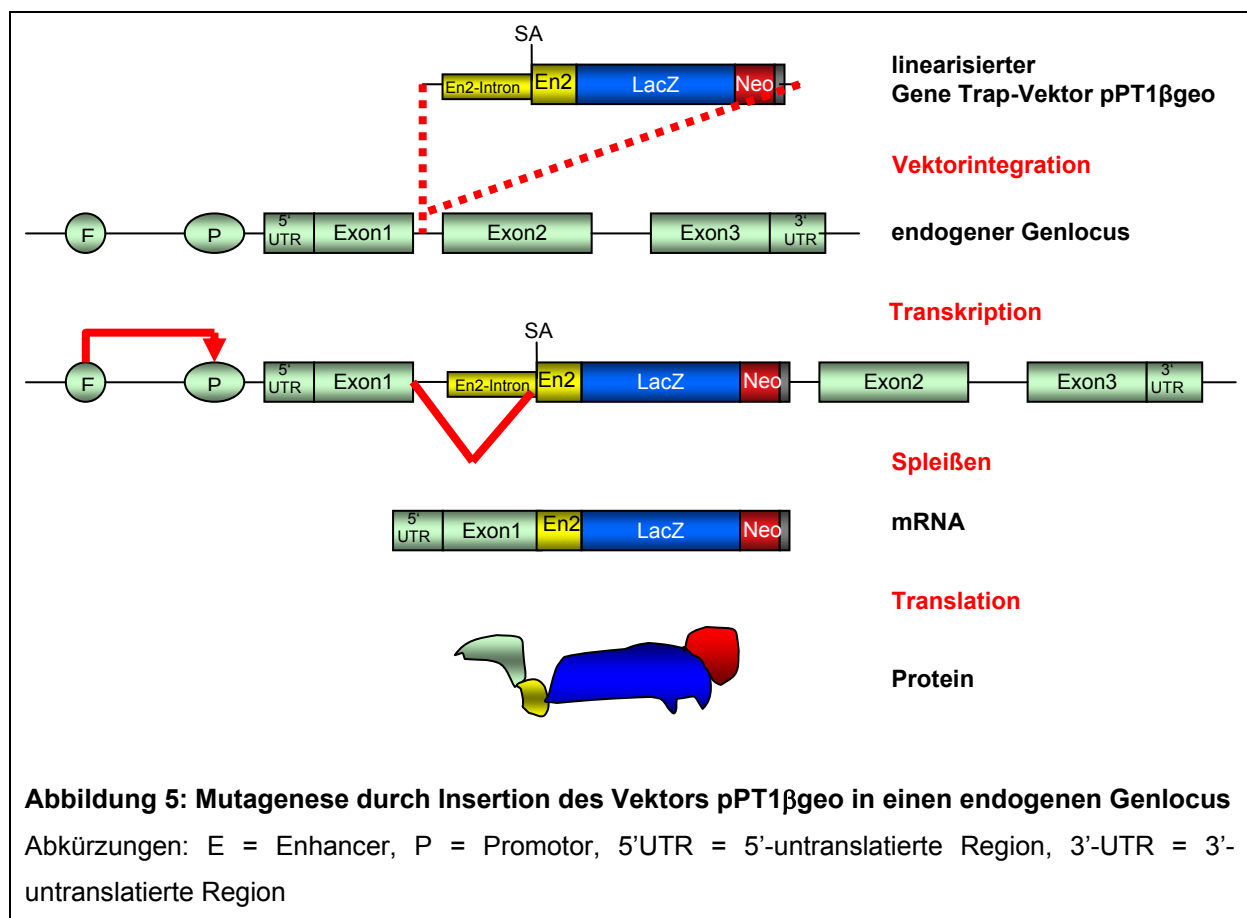
2.3 Mutation des murinen *Bptf/Fac1*-Gens durch einen Gene Trap-Vektor

Im Rahmen eines Gene Trap (Genfallen)-Experiments und des Screenings von ES-Zellklonen mit einem positiven Integrationsereignis, wurde durch eine 5'-RACE (5'-Rapid Amplification of cDNA Ends), anschließende Sequenzierung der erhaltenen Produkte und Vergleich der Sequenzen in Datenbanken unter anderem der Klon A012C04 mit einer Integration des Gene Trap-Vektors pPT1 β geo in das voraussichtliche Intron 1 des murinen *Bptf/Fac1*-Locus identifiziert.

Der Gene Trap-Vektor pPT1 β geo ist ein Splice-Acceptor Trap-Vektor mit einer Größe von 8.9 kb (Abb. 4). Er beinhaltet eine *Engrailed 2*-Spleißakzeptorsequenz (SA), die in 5'-Richtung von einem Teil des *Engrailed 2*-Introns (En2-Intron) und in 3'-Richtung von einem Teil des *Engrailed 2*-Exons (En2-Exon) flankiert wird. In 3'-Richtung vom *Engrailed 2*-Exon folgen zuerst eine *LacZ*-cDNA-Sequenz (LacZ), dann eine *Neomycin*-Kassette (Neo) und abschließend ein Simian Virus 40-Polyadenylierungssignal (SVpA). Das *LacZ*-Reporterogen kodiert für das bakterielle Enzym β -Galactosidase und die *Neomycin*-Kassette für die Neomycin-Phosphotransferase, die eine Selektion positiver Klone beispielsweise durch das Zytostatikum G418 ermöglicht.



Nach der Transkription wird die Vektorsequenz an das in 5'-Richtung gelegene endogene Exon gespleißt. So entsteht eine mRNA, die alle in 5'-Richtung gelegenen Exons des getrappten Gens sowie die Vektorsequenzen ab dessen 5'-Spleißakzeptor bis zum Polyadenylierungssignal enthält. Im folgenden wird bei der Translation ein Fusionsprotein gebildet, das sich aus dem N-terminalen Bereich des vom getrappten Gen kodierten Proteins sowie aus der von der Vektorsequenz kodierten Polypeptidkette zusammensetzt. Das Fusionsprotein hat deshalb die Aktivität der β -Galactosidase und besitzt eine Resistenz gegen G418 (Abb. 5).



Aus dem Klon A012C04 wurde eine ES-Zelllinie generiert. Durch Morula-Aggregation wurde mittels dieser ES-Zellen die Mauslinie A012C04 etabliert. Da die Vektorintegration sehr nahe am 5'-Ende des Gens liegt, scheint die Mauslinie A012C04 sehr gut dazu geeignet, einen Hinweis auf die Funktion von Bptf/Fac1 zu bekommen, indem man den Phänotyp nach Funktionsverlust des Genproduktes untersucht.

2.4 Ziele der Dissertation

Das *Nurf301*-Gen von *Drosophila melanogaster* wurde als Bestandteil des NURF-Komplexes identifiziert, der an der Umgestaltung der Chromatinstruktur durch Positionsverschiebung der Nukleosomen beteiligt ist (Badenhorst *et al.*, 2002). Das menschliche Ortholog bildet die zwei Isoformen Fac1 und Bptf, die bisher getrennt betrachtet wurden. Eine neuronale Expression und eine mögliche Funktionen bei der Regulation von Genen wurden in verschiedenen Studien untersucht (Bowser *et al.*, 1995; Jordan-Sciutto *et al.*, 1999 I; Barak *et al.*, 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeiten deuten eine Funktion während der Neuronalentwicklung an.

Im Rahmen dieser Dissertation soll das vollständige murine *Bptf/Fac1*-Gen charakterisiert werden, da nach den Erkenntnissen über die menschlichen Orthologe zumindest teilweise funktionelle Unterschiede zwischen beiden Isoformen bestehen dürften. Dazu sollen die Genstruktur (cDNA-Sequenz, Exon-Intron-Struktur, evtl. vorhandene Isoformen, evtl. vorhandene Spleißvarianten, Aminosäuresequenz, mögliche funktionelle Proteindomänen, Homologie zu orthologen Sequenzen) sowie die Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung und während der postnatalen Gehirnentwicklung dargestellt werden. Außerdem soll die Funktion von Bptf/Fac1 untersucht werden, indem der Phänotyp einer Gene Trap-Mutation beschrieben wird, die beide Isoformen inaktiviert. Zur Analyse der Funktion wird die Mauslinie A012C04 herangezogen, deren Gene Trap-Vektor-Insertion in den *Bptf/Fac1*-Locus charakterisiert wird und für die Strategien zur Genotypisierung mittels Southern-Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) etabliert werden. Die Untersuchung des Phänotyps erfolgt an Nachkommenschaften von Verpaarungen heterozygoter Männchen mit heterozygoten Weibchen. Die Analyse erfolgt hinsichtlich Genotypenverhältnis, Morphologie, Anatomie und Histologie, nach Möglichkeit darüber hinaus auch hinsichtlich molekularer Zusammenhänge.

3 Material

3.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Laborgeräte:

Vibrotom VT 1000 E	Leica
Mikrotom Jung Autocut 2055	Leica
Mikroskop Leitz DMRBE	Leica
Binokulare MZ125 und MZFLIII	Leica
Binokular	Zeiss
Digitalkamera DMC 2	Polaroid
Digitalkamera ProgRes C12	Jenoptik
Geldokumentation CS1	Cybertech
Geldokumentation Video Copy Processor P67E	Mitsubishi
Photometer Ultrospec 2100pro	Labcrew
Thermocycler PTC-200	MJ Research
Sequenzierer Abi Prism™310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems (Perkin Elmer)
Mikroliter-Pipetten	Eppendorf, Gilson
Waagen U6100, AC 120 S und LC 220 S	Sartorius
Gelkammern	Easy Cast Electrophoresis System
Power-Supply 200/2.0	Biorad
Vakuum-Blotting-Apparatur VacuGene XL	Pharmacia Biotech
UV-Crosslinker UV Stratalinker™ 2400	Stratagene
Hybridisierungsöfen QV10	Biometra
Hybridisierungsröhrchen HB-OV-BM	Hybaid
Expositionskassetten	AGFA-Gevaert
Inkubatoren	Heraeus Instruments
Schüttelinkubatoren G24 und G25	New Brunswick Scientific
Wasserbäder	GFL
Thermomixer 5436	Eppendorf

Vortexer Certomat MV	B. Braun Biotech International
Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel
Kühlzentrifuge J2 MC	Beckman
Tischzentrifugen	Eppendorf
Vakuumzentrifuge UNIVAPO 150 H	UNIEQUIP
Kühlfalle UNICRYO MC 2L-60.0 C	UNIEQUIP
Magnetrührer MR 80 und MR2000	Heidolph
Magnetrührer IKAMAG TM RH und KMO2	Janke & Kunkel
Mikrowelle	LG Electronics
pH-Meter CG 804	Schott
UV-Tisch	Konrad Benda

Verbrauchsmaterial:

Nylonmembranen Hybond-XL	Amersham Pharmacia Biotech
Säulen MicroSpin Columns S-300 HR	Amersham Biosciences
Fotofilme	Amersham Biosciences
Poly-Lysin-beschichtete Objektträger	Menzel-Gläser
Deckgläschen	Menzel-Gläser
Hybrislips	Sigma-Aldrich
Plastikgefäße	Eppendorf, Falcon, Sarstedt, Greiner

3.2 Chemikalien

Chemikalien im analytischen Grad wurden von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich, J.T. Baker, Acros Organics, Merck, Serva, Fluka, Bio-Rad und Roche bezogen. Die Prähybridisierungslösung Rapid Hyb und das radioaktive Nukleotid α -³²P-dCTP wurden von Amersham Biosciences geliefert. Die unmarkierten und Digoxigenin-markierten Nukleotide für die *In vitro*-Transkription wurden von Roche erhalten.

3.3 Lösungen, Stammlösungen, Puffer und Medien

- 50 mg/ml Ampicillin
0.5 g Ampicillin-Natriumsalz pro 10 ml sterilem dH₂O
=> sterilfiltrieren
- 2% Blockierungslösung
2 g Blocking Reagent (Boehringer Mannheim) pro 100 ml Maleinsäurepuffer
=> bei 50°C lösen
- DAB-Färbelösung
pro 10 ml PBT:
10 mg DAB (=> 0.1%)
5 µl 30% H₂O₂ (=> 0.015%)
- Denaturierungslösung (für Southern-Blotting)
20 ml 5 N NaOH (=> 0.5 N)
33.3 ml 3 M NaCl (=> 0.5 M)
ad 200 ml mit dH₂O
- 50 x Denhardts
pro 500 ml sterilem dH₂O:
5 g Ficoll Typ 400 (=> 1%)
5 g Polyvinylpyrrolidon (=>1%)
5 g BSA (Fraktion V) (=>1%)
=> sterilfiltrieren
- 10 mg/ml Dextran-Blau
10 mg Dextran-Blau pro ml dH₂O
- 5 x DNA-Ladepuffer BPB
pro 50 ml dH₂O:
0.125 g Bromphenolblau (=> 0.25%)
0.125 g Xylencyanol FF (=> 0.25%)

7.5 g Ficoll Typ 400 (=> 15%)

- 5 x DNA-Ladepuffer Orange G

pro 10 ml dH₂O:

1 kleiner Spatel Orange G

2.5 g Ficoll Typ 400 (=> 25%)

- DNA-Lysepuffer

100 ml 1M Tris-Cl pH 8.5 (=> 100 mM)

50 ml 4M NaCl (=> 200 mM)

10 ml 0.5M EDTA pH 8.0 (=> 5 mM)

20 ml 10% SDS (=> 0.2%)

ad 1000 ml mit dH₂O

=> pH 8.5

vor Gebrauch 5µl 20 mg/ml Proteinase K pro ml (=> 100 µg/ml) hinzufügen

- 1% DOC (Natriumdesoxycholat)

10 g Natriumdesoxycholat pro 1000 ml dH₂O

- 0.5 M EDTA (Ethylendiamin-tetraacetat)

146.1 g EDTA (Salz der Säure) pro 1000 ml dH₂O

=> pH 8.0

- 0.1 M EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetat)

38 g EGTA pro 1000 ml dH₂O

=> pH 8.0

- 1%ige Eosin-Färbelösung

5 g Eosin Y pro 500 ml 0.05% Essigsäure

- 1% Ethidiumbromid

10 mg Ethidiumbromid pro ml H₂O

- Gelatine/Albumin
pro 100 ml 1x PBS:
0.49 g Gelatine (\Rightarrow 0.49%)
30 g Ovalbumin (\Rightarrow 30%)
20 g Saccharose (\Rightarrow 20%)
 \Rightarrow filtrieren
- Glutaraldehyd/PFA/PBT
80 μ l 25% Glutaraldehyd (\Rightarrow 0.2%)
10 μ l Tween 20 (\Rightarrow 0.1%)
ad 10 ml mit 4% PFA
- 2 mg/ml Glycin/PBT
2 mg Glycin pro ml PBT
- 10 mg/ml Hefe-tRNA
10 mg Hefe-tRNA pro ml DEPC-dH₂O
- 50 mg/ml Heparin
50 mg Heparin pro ml DEPC-dH₂O
- 6 % H₂O₂/PBT
pro 100 ml:
80 ml 1 x PBT
20 ml 30% H₂O₂ (\Rightarrow 6%)
- HSS (High Salt Solution)
100 ml 20 x SSC (\Rightarrow 2 x)
10 ml 10% SDS (\Rightarrow 0.1%)
ad 1000ml mit dH₂O
- 0.2 M Kaliumferricyanid
65.84 g K₃Fe(CN)₆ pro 1000 ml dH₂O

- 0.2 M Kaliumferrocyanid
84.48 g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ pro 1000 ml dH_2O
- 1 kb Plus DNA Leiter
300 μl 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL)
100 μl 10 x TBE (\Rightarrow 1 x)
200 μl 5 x DNA Ladepuffer (\Rightarrow 1 x)
ad 1000 μl mit dH_2O
- LacZ-Fixativ
pro 500ml:
421.5 ml dH_2O
50 ml 10 x PBS (\Rightarrow 1 x)
5 ml 1% DOC (\Rightarrow 0.01%)
5 ml 2% NP40 (\Rightarrow 0.02%)
1 ml 1 M MgCl_2 (\Rightarrow 2 mM)
4 ml 25% Glutar(di)aldehyd (\Rightarrow 0.2%)
13.5 ml 37% Formaldehyd (\Rightarrow 1%)
- LacZ-Waschlösung
pro 500 ml:
439 ml dH_2O
50 ml 10 x PBS (\Rightarrow 1 x)
5 ml 1% DOC (\Rightarrow 0.01%)
5 ml 2% NP40 (\Rightarrow 0.02%)
1 ml 1 M MgCl_2 (\Rightarrow 2 mM)
- LacZ-Färbelösung
pro 500 ml:
394 ml dH_2O
50 ml 10 x PBS (\Rightarrow 1 x)
5 ml 1% DOC (\Rightarrow 0.01%)
5 ml 2% NP40 (\Rightarrow 0.02%)
1 ml 1 M MgCl_2 (\Rightarrow 2 mM)

- 10 ml 1 M Tris pH 8.0 (\Rightarrow 20 mM)
- 12.5 ml 0.2 M Kaliumferricyanid (\Rightarrow 5 mM)
- 12.5 ml 0.2 M Kaliumferrocyanid (\Rightarrow 5 mM)
- 10 ml 50 mg/ml X-Gal in DMF (\Rightarrow 1 mg/ml)

- LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

pro 1000 ml dH₂O:

10 g Bactotrypton (\Rightarrow 1%)

5 g Hefe-Extrakt (\Rightarrow 0.5%)

10 g NaCl (\Rightarrow 1%)

\Rightarrow autoklavieren

vor Gebrauch 2 μ l 50 mg/ml Ampicillin pro ml LB-Medium (\Rightarrow 100 μ g/ml)

hinzufügen

- LB-Agar

15 g Bacto-Agar / 1000 ml LB-Medium

\Rightarrow autoklavieren

vor Gebrauch 2 μ l 50 mg/ml Ampicillin pro ml LB-Agar (\Rightarrow 100 μ g/ml)

hinzufügen

- 4 M LiCl

169.5 g LiCl pro 1000 ml sterilem dH₂O

- Lösung 1 für die *In situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten

500 ml 100% Formamid (\Rightarrow 50%)

250 ml 20 x SSC (\Rightarrow 5 x)

100 ml 10% SDS (\Rightarrow 1%)

ad 1000 ml mit sterilem dH₂O

- Lösung 2 für die *In situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten

500 ml 100% Formamid (\Rightarrow 50%)

100 ml 20 x SSC (\Rightarrow 2 x)

20 ml 10% SDS (\Rightarrow 0.2%)

ad 1000 ml mit sterilem dH₂O

- Lösung D unvollständig (für die RNA-Isolierung)
 - 250 g Guanidiniumthiocyanat
 - 293 ml steriles dH₂O
 - 17.6 ml 0.75 M Na-citrat pH 7.0
 - 26.4 ml 10% Natriumlaurylsarcosinat
- Lösung D vollständig (für die RNA-Isolierung)
 - pro 100 ml:
 - 98.667 ml Lösung D unvollständig
 - 0.333 ml 30% Antifoam A
 - 1 ml β -Mercaptoethanol
- LSS (Low Salt Solution)
 - 5 ml 20 x SSC (\Rightarrow 0.1 x)
 - 10 ml 10% SDS (\Rightarrow 0.1%)
 - ad 1000 ml mit dH₂O
- Maleinsäure-Puffer
 - 11.6 g Maleinsäure (\Rightarrow 100 mM)
 - 50 ml 3 M NaCl (\Rightarrow 150 mM)
 - 1 ml Tween 20 (\Rightarrow 0.1%)
 - ad 1000 ml mit sterilem dH₂O
 - \Rightarrow pH 7.5
- Maus-Embryopuder
 - Mausembryonen der Stadien E12.5-E14.5 in minimalem Volumen an 1 x PBS homogenisieren
 - Vierfaches Volumen an eiskaltem Aceton hinzufügen, mischen und für 30 Minuten auf Eis inkubieren
 - bei 8000 rpm für 10 Minuten in einer Beckman-Zentrifuge zentrifugieren
 - Überstand verwerfen und Pellet mit eiskaltem Aceton waschen
 - bei 8000 rpm für 10 Minuten in einer Beckman-Zentrifuge zentrifugieren
 - Pellet zu feinem Pulver zermörsern und lufttrocknen

- Medium A zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli* XL Blue 1
 - 0.5 ml 1 M MgSO_4 (\Rightarrow 10 mM)
 - 0.1 g Glukose (\Rightarrow 0.2%)
 - ad 50 ml mit LB-Medium
- Medium B zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli* XL Blue 1
 - 36 g Glycerin (\Rightarrow 36%)
 - 12 g PEG 6000 (\Rightarrow 12%)
 - 1.2 ml 1 M MgSO_4 (\Rightarrow 12 mM)
 - ad 100 ml mit LB-Medium
- MEMFA
 - 20 ml 1 M MOPS (\Rightarrow 100 mM)
 - 4 ml 0.1 M EGTA pH 8.0 (\Rightarrow 2 mM)
 - 0.2 ml 1 M MgSO_4 (\Rightarrow 1 mM)
 - 20 ml 37% Formaldehyd (\Rightarrow 3.7%)
 - ad 200 ml mit dH_2O
- Methanol/PBT
 - \Rightarrow 25%
 - \Rightarrow 50%
 - \Rightarrow 75%
- 1 M MgCl_2
 - 203.3 g MgCl_2 pro 1000 ml dH_2O
- 1 M MOPS (3-(N-morpholino)-propansulfonsäure)
 - 209.3 g MOPS pro 1000 ml sterilem dH_2O
 - \Rightarrow sterilfiltrieren
- Moviol
 - 2.5 g Moviol
 - 5 ml Glycerin
 - 2.5 ml Tris-Cl pH 8.5

ad 25 ml mit dH₂O

=> bei 50°C lösen

- 3 M Na-acetat pH 5.2
246.09 g Na-acetat pro 1000 ml sterilem dH₂O
- 3 M NaCl
175.32 g NaCl pro 1000 ml dH₂O
- Neutralisierungslösung (für Southern-Blotting)
pro 200 ml:
100 ml 1 M Tris-Cl pH 7.4 (=> 0.5M)
100 ml 3 M NaCl (=> 1.5 M)
- 2% NP40 (Nonylphenoxypolyethoxyethanol)
20 g NP40 pro 1000 ml dH₂O
- NTMT
pro 100 ml:
75 ml steriles dH₂O
3.3 ml 3 M NaCl (=> 100 mM)
10 ml 1 M Tris-HCl pH 9.5 (=> 100 mM)
5 ml 1 M MgCl₂ (=> 50 mM)
0.1 ml 100% Tween 20 (=> 0.1%)
- 0.1%ige Nuclear Fast Red-Färbelösung
0.1 g Nuclear Fast Red pro 100 ml 5% Al₂(SO₄)₃
- 10 x PBS
pro 1000 ml dH₂O:
80 g NaCl (=> 8%)
2 g KCl (=> 0.2%)
14.4 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O (=> 1.15%)
2 g KH₂PO₄ (=> 0.2%)

- 1 x PBT
 - 1 ml 100% Tween 20 (\Rightarrow 0.1%)
 - ad 1000 ml mit 1x PBS
- 4% PFA/PBS
 - pro 100 ml:
 - 4 g Paraformaldehyd (\Rightarrow 4%)
 - 10 ml 10 x PBS (\Rightarrow 1 x)
 - einige Tropfen 2 M NaOH
 - 90 ml steriles dH₂O
 - \Rightarrow pH 7.0
- 10% Pferdeserum/PBT
 - 1 ml 100% Pferdeserum pro 10 ml 1 x PBT
- Prähybridisierungslösung für die *In situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten
 - 5 ml 100% Formamid (\Rightarrow 50%)
 - 2.5 ml 20 x SSC (\Rightarrow 5 x)
 - 0.2 ml 50 x Denhardts (\Rightarrow 1 x)
 - 0.1 ml 10 mg/ml Hefe-tRNA (\Rightarrow 0.1 mg/ml)
 - 0.02 ml 50 mg/ml Heparin (\Rightarrow 0.1 mg/ml)
 - 0.1 ml 100% Tween 20 (\Rightarrow 0.1%)
 - ad 10 ml mit DEPC-H₂O
- 10 mg/ml Proteinase K
 - 10 mg Proteinase K pro ml 50 mM Tri-HCl pH 8.0
- 10 µg/ml Proteinase K/PBT
 - 1 µl 10 mg/ml Proteinase K pro ml PBT
- 1.2%iges RNA-Formaldehydgel
 - pro 100 ml Gel:
 - 1 g Agarose
 - 85 ml steriles dH₂O

10 ml 10x RNA-Laufpuffer (=> 1 x)

=> aufkochen, dann abkühlen lassen

bei 60°C 5.7 ml 37% Formaldehyd (=> 2.1%) hinzupipettieren

- 5 x RNA-Ladepuffer

pro 10 ml:

9 ml DEPC-H₂O

1 ml 5% Bromphenolblau

1.5 g Ficoll

- 10 x RNA-Laufpuffer

200 ml 1 M MOPS (=> 200 mM)

16.6 ml 3 M Na-acetat pH 5.2 (=> 50 mM)

10 ml 0.5 M EDTA (=> 5 mM)

ad 1000 ml mit sterilem dH₂O

=> pH 7.0

=> sterilfiltrieren

- 1 x RNA-Laufpuffer

pro 1100 ml:

968 ml steriles dH₂O

110 ml 10 x RNA-Laufpuffer (=> 1 x)

22 ml 37% Formaldehyd (=> 0.74%)

- RNA-Probenpuffer

pro 1000 µl:

212 µl DEPC-H₂O

100 µl 10x RNA-Laufpuffer (=> 1 x)

175 µl 37% Formaldehyd (=> 6.5%)

500 µl 100% Formamid (=> 50%)

10 µl 10% SDS (=> 0.1%)

3 µl 10 mg/ml Etidiumbromid (=> 30 µg/ml)

- 10 mg/ml RNase A
10 mg RNase A (DNase-frei) pro ml Puffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5 / 15 mM NaCl)
=> 15 Minuten bei 100°C kochen
- 100 µg/ml RNase A/Lösung 2
1 ml 10 µg/µl RNase A pro 100 ml Whole mount *In situ*-Lösung 2
- 10% Schafserum/TBST
1 ml 100% Schafserum pro 10 ml 1x TBST
- 10% SDS
100 g SDS pro 1000 ml dH₂O
=> pH 7.2
- 40 mM Spermidin (N-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane, 1,5,10-triazadecan)
5.8 mg Spermidin pro ml dH₂O
- 20 x SSC
pro 1000 ml dH₂O:
175.3 g NaCl (=> 17.5%)
88.2 g Na-citrat x 2 H₂O (=> 7.7%)
=> pH 4.5
=> pH 7.0
- Stopmix
pro 1000 µl:
400 µl 0.5 M EDTA (=> 0.2 M)
600 µl 10 mg/ml Dextran-Blau
- 50 x TAE
242 g Tris (=> 24.2%)
57.1 ml Essigsäure (=> 57.1%)
100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 (=> 50 mM)

ad 1000 ml mit dH₂O

- 10 x TBE

pro 1000 ml dH₂O:

108 g Tris (=> 10.8%)

55 g Borsäure (=> 5.5%)

9.3 g EDTA (=> 0.93%)

=> pH 8.0

- 10 x TBST

pro 100 ml:

74 ml steriles dH₂O

25 ml 1 M Tris-HCl pH 7.5 (=> 250 mM)

1 ml 100 % Tween 20 (=> 1%)

8 g NaCl (=> 8%)

0.2 g KCl (=> 0.2%)

- 10 x TE (Tris/EDTA)

100 ml 1 M Tris-HCl pH 8.0 (=> 100 mM)

20 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 (=> 10 mM)

ad 1000 ml mit dH₂O

- TNT

10 ml 1 M Tris-Cl pH 7.5 (=> 10 mM)

166 ml 3 M NaCl (=> 500 mM)

1 ml Tween 20 (=> 0.1%)

ad 1000 ml mit dH₂O

- 0.1 M Triethanolamin

100 ml 1 M Triethanolamin

ad 1000 ml mit sterilem dH₂O

=> pH 8.0

- 1 M Tris-Cl
121.1 g Tris pro 1000 ml dH₂O
=> pH 7.2
=> pH 7.4
=> pH 8.0
=> pH 8.5
=> pH 9.5
- Whole mount *In situ*-Hybridisierung-Lösung 1
pro 100 ml:
50 ml 100% Formamid (=> 50%)
15 ml steriles dH₂O
25 ml 20 x SSC pH 4.5 (=> 5 x)
10 ml 10 % SDS (=> 1%)
- Whole mount *In situ*-Hybridisierung-Lösung 2
pro 100 ml:
50 ml 1 M NaCl (=> 500 mM)
49 ml steriles dH₂O
1 ml 1 M Tris-HCl pH 7.5 (=> 10 mM)
0.1 ml 100% Tween 20 (=> 0.1%)
- Whole mount *In situ*-Hybridisierung-Lösung 3
pro 100 ml:
50 ml 100% Formamid (=> 50%)
40 ml steriles dH₂O
10 ml 20 x SSC pH 4.5 (=> 2 x)
- Whole mount *In situ*-Hybridisierung-Prähybridisierungslösung
pro 100 ml:
50 ml 100% Formamid (=> 50%)
13.5 ml DEPC-dH₂O
25 ml 20 x SSC pH 4.5 (=> 5 x)
10 ml 10 % SDS (=> 1%)

0.5 ml 10 mg/ml Hefe-tRNA (\Rightarrow 50 μ g/ml)

0.1 ml 50 mg/ml Heparin (\Rightarrow 50 μ g/ml)

- 50 mg/ml X-Gal in DMF

50 mg X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) pro ml
DMF (N,N-Dimethylformamid)

3.4 Enzyme und Antikörper

Enzyme:

Proteinase K	(20 μ g/ μ l)	Roth
RNase A	(10 μ g/ μ l)	Roth
RNasin® RNase-Inhibitor	(100 U/ μ l)	Promega
RQ1-DNase	(1 U/ μ l)	Promega
SP6- RNA-Polymerase	(14 U/ μ l)	Promega
T3-RNA-Polymerase	(17 U/ μ l)	Promega
T7-RNA-Polymerase	(20 U/ μ l)	Promega
Superscript™ III Reverse Transkriptase	(200 U/ μ l)	Invitrogen
Hot Star Taq-Polymerase	(5 U/ μ l)	Qiagen
rTaq-Polymerase	(5 U/ μ l)	Amersham Biosciences

Die Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs bezogen.

Antikörper:

Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmente	(150 U/200 μ l)	Roche
Anti-Neurofilament-Antikörper 2H3		Developmental Studies Hybridoma Bank of Iowa
Merrettich-Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus IgG (H+L) aus dem Pferd		Vector Laboratories

3.5 Kits

Qiaquick® PCR Purification Kit	Qiagen
Qiaquick® Nucleotide Removal Kit	Qiagen
Qiaex® II Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiaprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
Qiagen® Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Oligotex® Direct mRNA Micro Kit	Qiagen
pGEM® –T Vector System I	Promega
pGEM® –T Easy Vector System I	Promega
Megaprime DNA Labelling System	Amesham Biosciences
Big Dye terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
TSR (Template Suppression Reagent)	Applied Biosystems

3.6 Primer

Zum Primerdesign wurde das Programm Oligo 4.0 benutzt. Die Primer wurden von den Firmen Roth und Operon synthetisiert.

Bptf/Fac1-Primer:

Name	Bezugssequenz	Position	5' - 3' - Sequenz
E1-U41	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 1	Upper 41	ACGATGACCACGAGAGTGAC
E1-U195	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 1	Upper 195	TCCGGAGGAGATGGAAGA
I1-U866	<i>Bptf/Fac1</i> Intron 1	Upper 866	CTGTTGCCGAAGATGTGT
I1-U2564	<i>Bptf/Fac1</i> Intron 1	Upper 2564	CCTGGCTGTCCTGGAAC
I1-U3377	<i>Bptf/Fac1</i> Intron 1	Upper 3377	TGCCCAGCCAATGTGTAT
I1-U4760	<i>Bptf/Fac1</i> Intron 1	Upper 4760	TGCCAAAGACACATCAAAC
I1-U6042	<i>Bptf/Fac1</i> Intron 1	Upper 6042	GCTGGCCTTGAACCTGTG
I1-U6144	<i>Bptf/Fac1</i> Intron 1	Upper 6144	CGGGCAGAGTTCTGACAG
I1-L6651	<i>Bptf/Fac1</i> Intron 1	Lower 6651	TGCCCACACTTGACTATCAG
I1-U7581	<i>Bptf/Fac1</i> Intron 1	Upper 7581	CCGTGGTCTGGTGAGAGA
I1-U8794	<i>Bptf/Fac1</i> Intron 1	Upper 8794	GGGACCAGAAAGGAATGAG
I1-U11960	<i>Bptf/Fac1</i> Intron 1	Upper 11960	CCTGGGGATTGAACCTGAG
I1-U13786	<i>Bptf/Fac1</i> Intron 1	Upper 13786	GCCATCCCCAAATAACAC
I1-U15357	<i>Bptf/Fac1</i> Intron 1	Upper 15357	CGTTTGCTCGTCTTCTTAGT

I1-U16914	<i>Bptf/Fac1</i> Intron 1	Upper 16914	AGTGCGGGAGGCTTAGTC
I1-U18369	<i>Bptf/Fac1</i> Intron 1	Upper 18369	ACCTGCCTCTCCTCACTAAG
E2-U3	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 2	Upper 3	AGGCGAAAACCAAGAGTACA
E2-U308	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 2	Upper 308	TGCGGACTTGAAAGACAGT
E2-U641	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 2	Upper 641	GCCGCCTCTTGAAGAAGT
E2-L663	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 2	Lower 663	CCGGCACTTCTTCAAGAG
E3/4-U212	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 3/4	Upper 212	GCGGCAGCTAATGAGGAA
E7-L105	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 7	Lower 105	CCGGGTTCCTCAGTCTGG
E8-L247	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 8	Lower 247	ACCCGTTCCATTTGAACT
E9/10-L22	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 9/10	Lower 22	AATTGATGTCATCCTATGTAACC
E13-U139	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 13	Upper 139	GGGCAATGGAGCTGTCTA
E13-L121	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 13	Lower 121	GTGGCATCTGCATCTCTG
E14-U424	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 14	Upper 424	GGGGCTCACAAAGTGATC
E14-L907	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 14	Lower 907	TCCCGAATACACATATTATCAG
E15-L29	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 15	Lower 29	CCAGCCAAGGACTTTACC
E15-U56	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 15	Upper 56	GGGCCAGTTTGAGATGG
E19-U52	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 19	Upper 52	CCCCAGCAAACAACACAA
E20-L87	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 20	Lower 87	TGGGCTGGAATGAAGTAAA
E23-U3	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 23	Upper 3	CGGCAACCAAGGTTTAAC
E23-L44	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 23	Lower 44	TGCCCTTGTCTTGAATC
E24-U369	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 24	Upper 369	CCCCAGGTTCCAGACTACAG
E28-U123	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 28	Upper 123	GCAGCAGTGAGGAATTGTAC
E28-L114	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 28	Lower 114	GCCCGCTTACAATCATTAC
E32-U79	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 32	Upper U79	GGCGCTCTGAACTATTTAAA
E32-L108	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 32	Lower 108	GGCGCTTTAGTTTAAATAGTT
E32-L666	<i>Bptf/Fac1</i> Exon 32	Lower 666	TCCCGTGAACAATAAACTCA

Primer für den Gene Trap-Vektor pPT1 β geo:

Name	Bezugssequenz	Position	5' - 3' - Sequenz
pPT1 β geo-L331	pPT1 β geo	Lower 331	CGCCATACAGTCCTCTTCA
pPT1 β geo-L543	pPT1 β geo	Lower 543	TGCGGTACCAGACTCTCC
pPT1 β geo-L929	pPT1 β geo	Lower 929	ACGGGTCTTCTGTTAGTCC
pPT1 β geo-L971	pPT1 β geo	Lower 971	TGGGCAAGAACATAAAGTGA
pPT1 β geo-U3849	pPT1 β geo	Upper 3849	GGTGGCGCTGGATGGTAA
pPT1 β geo-L4496	pPT1 β geo	Lower 4496	CGCCATTTGACCACTACC

Primer für andere cDNAs:

Name	Bezugssequenz	Position	5'- 3' - Sequenz
App-U240	<i>App</i> cDNA U84012	Upper 240	CGCCATGTTCTGTGGTAA
App-L894	<i>App</i> cDNA U84012	Lower 894	GTCCCCATCCTCCACATC
Cdx2-U349	<i>Cdx2</i> cDNA NM_007673	Upper 349	TCCGCAGAACTTTGTCAGT
Cdx2-L1584	<i>Cdx2</i> cDNA NM_007673	Lower 1584	CCCCATCCAGTCTCACTCT
Hand1-U58	<i>Hand1</i> cDNA BC050182	Upper 58	GGCAGGTCCTTCGTATCA
Hand1-L1104	<i>Hand1</i> cDNA BC050182	Lower 1104	GGCGGGAAGTGAACATATA
Mash2-U418	<i>Mash2</i> cDNA U77628	Upper 418	CGCACCAGAACTCGTAGC
Mash2-L1044	<i>Mash2</i> cDNA U77628	Lower 1044	CCCCCTAACCAACTGGAA
Oct4-U394	<i>Oct4</i> cDNA NM_013633	Upper 394	TGCCGTGAAGTTGGAGAA
Oct4-L973	<i>Oct4</i> cDNA NM_013633	Lower 973	GGGGCAGAGGAAAGGATA
Psen1-U202	<i>Psen1</i> cDNA NM_008943	Upper 202	GGCGCTTGTTCTTTCTTC
Psen1-L1068	<i>Psen1</i> 1 cDNA NM_008943	Lower 1068	CGGCGACATTGTAGGTCT

3.7 Vektoren

pGEM®-T Easy Vector:

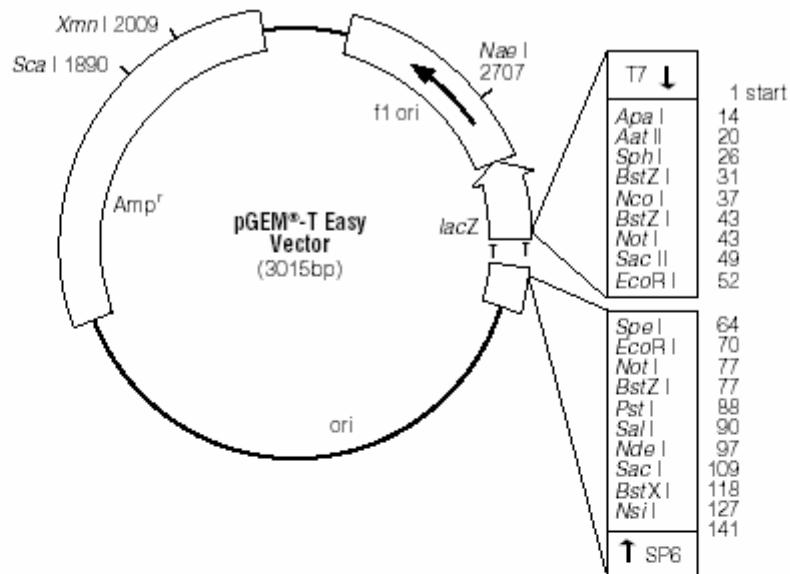


Figure 3. pGEM®-T Easy Vector circle map and sequence reference points.

pGEM®-T Easy Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	141
T7 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3
SP6 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
multiple cloning region	10-128
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
<i>lac</i> operator	200-216
β -lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
binding site of pUC/M13 Forward Sequencing Primer	2956-2972
binding site of pUC/M13 Reverse Sequencing Primer	176-192

3.8 Plasmide und RNA-Sonden für die *In situ*-Hybridisierung

Plasmide					Antisense RNA-Sonden	
Gen	Konstrukt	Vektor (Länge)	Insertlänge (cDNA-Bereich) (Bezugssequenz)	konstruiert von	linearisiert mit	RNA-Polymerase
<i>App</i>	Plasmid APP-2	pGEM T Easy (3015 bp)	655 bp (nt 240-894) (U84012)	Tobias Goller	Sall	T7
<i>Bptf/Fac1</i> (5'-Fragment)	FAC1-A-A	pGEM T Easy (3015 bp)	764 bp (nt 195-958) (cDNA-Sequenz)	Tobias Goller	SpeI	T7
<i>Bptf/Fac1</i> (3'-Fragment)	BPTF-3'UTR	pGEM T Easy (3015 bp)	588 bp (nt 8601-9188) (cDNA-Sequenz)	Tobias Goller	SpeI	T7
<i>Bmp4</i>	pBMP4	pSP72	ca. 1 kb	erhalten von Iris Kautzner (Arnold Labor)	EcoRI	SP6
<i>Brachyury</i>	pSK75	pBS-SK (3.0 kb)	1770 bp (5'-EcoRI-Fragment)	erhalten von Achim Gossler	BamHI	T7
<i>Cdx2</i>	Cdx2	pGEM T Easy (3015 bp)	1138 bp (nt 349-1584) (NM_007673; außer nt 650-747)	Tobias Goller	SpeI	T7
<i>Cer1</i>	mCer1 (NM_009887)	pSPORT1 (4109 bp)	1582 bp (nt 174-1755)	erhalten von Achim Gossler	Sall	SP6
<i>Chordin</i>	5' Chd	pBS-KS (3.0 kb)	1799 bp (5'-EcoRI-Fragment)	Daniel Bachiller (Rossant Labor)	NotI	T3
<i>Eomesodermin</i>	Eomesodermin	pBSII-SK (3.0 kb)	1183 bp (HpaI-Fragment)	Sebastian Arnold (Robertson Labor)	EcoRI	T7

<i>Foxa2</i>	pGEM3-lambda3.1	pGEM3 (2743 bp)	1.1 kb	K. Zaret (Rossant Labor)	HindIII	T7
<i>Hand1</i>	Plasmid Hand1	pGEM T Easy (3015 bp)	1047 bp (nt 58-1104) (BC050182)	Tobias Goller	NcoI	SP6
<i>Mash2</i>	Plasmid Mash2	pGEM T Easy (3015 bp)	627 bp (nt 418-1044) (U77628)	Tobias Goller	NcoI	SP6
<i>Nodal</i>	pSK Nodal	pBSII (3.0 kb)	1080 bp (nt 325-1404)	C. Meno (Wrana Labor)	BamHI	T7
<i>Oct4</i>	Oct4 (Pou5f1)	pGEM T Easy (3015 bp)	580 bp (nt 394-973) (NM_013633)	Tobias Goller	NcoI	SP6
<i>Presenilin 1</i>	Plasmid PS1-1	pGEM T Easy (3015 bp)	867 bp (nt 202-1068) (NM_008943)	Tobias Goller	Sall	T7

3.9 Bakterienstämme

Zur Transformation von Plasmiden wurde der *Escherichia coli*-Stamm XL Blue 1 verwendet. Um die Bakterienzellen transformationskompetent zu machen, wurden sie in 100 ml LB-Medium bei 37°C bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0.5$ kultiviert und dann bei 4°C und 1500 g pelletiert. Das Pellet wurde in 500 µl eiskaltem Medium A resuspendiert, dann wurde die Suspension mit 2.5 ml Medium B gemischt. Schließlich wurden die Zellsuspensionen zu 100 µl aliquotiert und bei –80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.10 Computerprogramme

Bildbearbeitung

Adobe® Photoshop® 7.0

Sequenzanalyse

Lasergene Navigator (EditSeq, MapDraw, MegAlign, SeqMan II) von DNASTAR

Primerdesign	Oligo 4.0
Textbearbeitung, Statistik, Präsentation	Microsoft Office

3.11 Molekularbiologische Datenbanken

www.ensembl.org
www.epd.isb-sib.ch
www.expasy.org
www.genetrap.org
www.informatics.jax.org
www.ncbi.nlm.nih.gov

3.12 Histologische Atlanten und Datenbanken

Atlanten:

Kaufman M.H.:

The atlas of mouse development. Academic Press 1992

Schambra U.B., Lauder J.M., Silver J.:

Atlas of the prenatal mouse brain. Academic Press 1992

Franklin K.B.J., Paxinos G.:

The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press 1997

Datenbanken:

www.gnex.hgu.mrc.ac.uk

www.hms.harvard.edu/research/brain/index.html

www.nervenet.org

www.rodentia.com

3.13 Mausstämme, Maushaltung und Bestimmung der Embryonalstadien

LacZ-Färbungen und Phänotypanalyse (Morphologie, Hämatoxylin/Eosin-Färbung) wurden an Embryonen und Geweben der Gene Trap-Mauslinie A012C04 in den genetischen Hintergründen CD1 (ICR), C57BL/6J und 129S2/SvHsd durchgeführt. Bei CD1 (ICR) handelt es sich um einen Auszuchtstamm mit einem heterogenen genetischen Hintergrund, C57BL/6J und 129S2/SvHsd sind Inzuchtstämme mit einem sehr homogenen genetischen Hintergrund. Alle Analysen in den genetischen Hintergründen der Inzuchtstämme wurden an Embryonen durchgeführt, deren Eltern mindestens der siebten Rückkreuzungsgeneration angehörten, d.h. statistisch über 99% mit dem entsprechenden Hintergrund genetisch identisch sind. RNA für die Northern-Hybridisierung und die RT-PCR-Versuche wurden aus Organen von CD1 (ICR)-Mäusen isoliert. Für *In situ*-Hybridisierungen an Wildtyp-Embryonen wurden Mäuse des Stammes CD1 (ICR) verwendet. Die *In situ*-Hybridisierungen zur Phänotypanalyse wurden an Embryonen der Mauslinie A012C04 im gemischten genetischen CD1 (ICR)-Hintergrund durchgeführt. Für die Letalitätsstatistik wurden Mäuse und Embryonen der Linie A012C04 im genetischen C57BL/6J-Hintergrund verbraucht.

Zur Verpaarungen wurden ein Männchen mit einem oder zwei Weibchen zusammengesetzt. Zur Kontrolle, ob eine Verpaarung stattgefunden hat, wurden die Weibchen am folgenden Morgen zwischen 8 Uhr und 11 Uhr auf das Vorhandensein eines Vaginalpropfs hin untersucht.

Zur vorläufigen Determinierung der Embryonalstadien, um die Sektion von Embryonen bestimmter Entwicklungsstufen zu ermöglichen, wurde der Beginn der Embryogenese für Mitternacht in der Nacht der erfolgten Verpaarung festgelegt, so daß sich die Embryonen am folgenden Tag um 12 Uhr im Embryonalstadium E0.5 befinden. Zur eindeutigen Bestimmung des Embryonalstadiums wurden die Embryonen nach der Sektion untersucht und anhand verschiedener Merkmale (Anzahl der Somiten, Entwicklungsstand der Extremitäten usw.) einem genauen Stadium zugeordnet. Für die postnatalen Stadien wurde der Tag der Geburt als Stadium P0 festgelegt.

Angaben zur Maushaltung:

- Temperatur: 25°C
- relative Luftfeuchtigkeit: 70%
- Lichtphase: 5 Uhr - 19 Uhr
- Dunkelphase: 19 Uhr - 5 Uhr
- Versorgung mit Trockenfutter und Wasser ad libitum

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Genotypisierung von Mäusen und Embryonen

Sowohl zur Zucht als auch zur Phänotypanalyse ist es nötig, Mäuse bzw. Embryonen zu genotypisieren.

Hierzu wurden zwei Methoden verwendet:

1. die Hybridisierung restriktionsverdauter genomischer DNA mit einer markierten Sonde, welche die Unterscheidung von Wildtyp- und mutiertem Allel anhand eines Restriktionsfragment-Längenpolymorphismuses (RFLP) ermöglicht,
2. die PCR-Amplifikation von Wildtyp- und mutiertem Allel aus genomischer DNA mittels gen- und vektorspezifischer Primer, welche die Unterscheidung beider Allele ebenfalls anhand unterschiedlicher Fragmentlängen gewährleistet.

Die Hybridisierungsmethode erfordert eine gewisse Menge an Gewebematerial, weshalb sie nur zur Genotypisierung von juvenilen und adulten Mäusen sowie Embryonen ab dem Stadium E12.5 verwendet wurde. Wegen der geringeren erforderlichen Ausgangsmenge an DNA wurde für die Genotypisierung von Embryonen, die jünger als E12.5 sind, ausschließlich die PCR-Methode angewendet. Da bei der PCR-Genotypisierung außerdem der Zeitaufwand deutlich geringer ist, wurde diese Methode unabhängig von der Ausgangsmenge an DNA bevorzugt benutzt.

4.1.1.1 Genotypisierung durch radioaktive Hybridisierung restriktionsverdauter genomischer DNA

Für die Hybridisierungsmethode wird zuerst genomische DNA aus Gewebematerial isoliert, dann wird die DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen fragmentiert, die Fragmente werden in einem Agarosegel der Länge nach aufgetrennt und auf eine

Nylonmembran übertragen (Southern-Blotting), die dann mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert wird.

Genomische DNA wurde aus den Spitzen von Mausschwänzen bzw. aus Fruchtblasen von Embryonen durch Inkubation mit DNA-Lysepuffer mit 100 µg/ml Proteinase K bei 55°C über Nacht freigesetzt, durch Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung ausgesalzen und durch Zugabe von Phenol (pH 7.5-8.0) und eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) extrahiert. Der DNA-enhaltende Überstand wurde abgenommen und die DNA mit 100% Ethanol ausgefällt, mit 70% Ethanol von residualen Salzen freigewaschen und in einem adäquaten Volumen 1 x TE-Puffer resuspendiert. Genomische DNA aus Mäusen und Embryonen der Linie A012C04 wurde zur weiteren Analyse mit der Restriktionsendonuklease Bgl II geschnitten, in einem 0.8%igen Agarosegel (0.8% Agarose in 1 x TBE) aufgetrennt und durch Vakuum-Blotting auf eine Nylonmembran übertragen. Beim Vakuum-Blotting wurde die DNA zunächst für 10 bis 20 Minuten mit 0.2 N HCl depuriniert, dann 30 Minuten mit 0.5 N NaOH / 0.5 M NaCl denaturiert, danach 30 Minuten mit 1.5 M NaCl / 1 M Tris-Cl pH 7.4 neutralisiert und schließlich durch eine 30minütige Inkubation mit 20 x SSC vom Gel auf die Nylonmembran transferiert. Um die DNA kovalent an die Membran zu binden, wurde der Blot mit UV-Licht (120 mJ) bestrahlt. Vor der Hybridisierung wurde die Membran zunächst 30 Minuten mit HSS gewaschen und dann 20 Minuten mit Prähybridisierungslösung inkubiert. Zur Genotypisierung von Individuen der Linie A012C04 wurde als Sonde ein durch Nested-PCR aufgereinigtes 750 bp PCR-Fragment verwendet, das die Nukleotide 5902 bis 6651 aus dem Intron 1 des *Bptf/Fac1*-Gens enthält. Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte nach der Random Primer-Methode mit dem Nukleotid α -³²P-dCTP und dem Megaprime DNA Labelling System (Amersham Biosciences) gemäß den Angaben des Herstellers für 50 Minuten bei 37°C. Die Sonde wurde durch 3-minütige Zentrifugation bei 4000 rpm über eine MicroSpin Column S-300 HR (Amersham Biosciences) aufgereinigt. Zur Hybridisierung wurde die mit radioaktivem ³²P markierte Sonde mit einer Aktivität von 1.25 Mio. cpm pro ml Hybridisierungslösung auf die Membran gegeben und für 2 Stunden bei 65°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran dreimal für jeweils 15 Minuten bei 60°C mit LSS gewaschen, um ungebundene Sonde zu

entfernen. Die Membran wurde auf einen Fotofilm gelegt und bei -80°C in einer Kassette exponiert. Nach ein bis zwei Tagen wurde der Film entwickelt.

4.1.1.2 PCR-Genotypisierung

Für die PCR-Genotypisierung von Mäusen und Embryonen wird DNA durch alkalische Lyse aus Schwanzspitzen, Fruchtblasen oder ganzen Embryonen (E3.5-9.5) isoliert. Hierzu wurde das Gewebe 15 Minuten in einem adäquaten Volumen an 50 mM NaOH aufgekocht. Danach wurde die Lösung mit einem Viertel Volumen 1M Tris-Cl pH 8.0 neutralisiert. Je nach DNA-Konzentration wurden bis zu 2 μl der DNA-Lösung für die PCR eingesetzt. Für die PCR-Genotypisierung von Individuen der Linie A012C04 wurden die rTaq DNA Polymerase (Amersham Biosciences) und die drei Primern I1-U6144, I1-L6651 und pPT1 β geo-L331 verwendet. Pro DNA-Probe wurden bei 20 μl Reaktionsvolumen 200 μM dNTP-Mix, 800 nM jedes Primers und 1 Unit rTaq DNA-Polymerase eingesetzt. Nach 5 Minuten bei 94°C erfolgten 36 Zyklen mit jeweils 30 Sekunden bei 94°C , jeweils 30 Sekunden bei 58°C und jeweils 50 Sekunden bei 72°C , abschließend erfolgten noch einmal 5 Minuten bei 72°C . I1-U6144 amplifiziert zusammen mit I1-L6651 das Wildtyp-Allel und zusammen mit pPT1 β geo-L331 das mutierte Allel. Die Analyse erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate in einem 1.2%igen Agarosegel in 1 x TBE.

4.1.2 Expressionsanalyse durch Northern-Hybridisierung

Durch Northern-Hybridisierung erfährt man über ein Gen zum einen, ob und es Isoformen oder Spleißvarianten gibt, und zum anderen, in welchen Organen oder Geweben es exprimiert ist.

Hierzu wird zunächst die Gesamt-RNA aus Organen bzw. Geweben isoliert, evtl. über eine Säulenaufreinigung die mRNAs von den rRNAs, tRNAs und anderen RNA-Typen getrennt, dann die RNA unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen und schließlich

die an die Membran gebundene RNA mit einer markierten genspezifischen cDNA-Sonde hybridisiert.

Zur RNA-Isolierung wurde ein isoliertes Organ oder Gewebe sofort nach der Entnahme zerkleinert, in flüssigem Stickstoff gefroren und durch Mörsern pulverisiert. Das Pulver wurde 15 Minuten in Lösung D geschüttelt und dann mit einem Ultra-Turrax weiter zerkleinert. Aus dem Lysat wurde die RNA durch Zugabe von saurem Phenol (pH 4.5-5.0) und Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Aus dem Überstand wurde die RNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 8M LiCl und einem Volumen kalten Isopropanols ausgefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in einem adäquaten Volumen DEPC-dH₂O resuspendiert. 20 µg RNA wurden in einem RNA-Formaldehydgel aufgetrennt und anschließend beim Northern-Blotting mit 10 x SSC in 4 Stunden unter Vakuum vom Gel auf eine Nylonmembran transferiert und durch UV-Bestrahlung (120 mJ) kovalent an diese gebunden. Die Durchführung der radioaktiven Hybridisierung beim Northern-Blot entsprach der beim Southern-Blot.

Zur Detektion von *Bptf/Fac1*-Transkripten wurde als Sonde ein mit ³²P-markiertes 752 bp langes cDNA-Fragment verwendet, das den 3'-Bereich von Exon1 und den 5'-Bereich von Exon 2 umfasst. Das cDNA-Fragment wurde durch eine semi-nested RT-PCR generiert. Dazu wurden für die erste PCR der Upper-Primer E1-U195 und der Lower-Primer E9/10-L22 verwendet und für die semi-nested PCR der Upper-Primer E1-U195 und der Lower-Primer E2-L663.

4.1.3 Expressionsanalyse durch RT-PCR (Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion)

Die RT-PCR ermöglicht ebenfalls die Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene. Bei geeigneter Auswahl der Primer können auch die Expressionsmuster verschiedener Spleißvarianten eines Transkriptes unterschieden werden. Die RT-PCR-Produkte können sequenziert und in einen Vektor kloniert werden. Da durch RT-PCR spezifische Bereiche eines Transkriptes in cDNA umgeschrieben und amplifiziert werden können, kann sie als Ausgangspunkt für die Konstruktion von

zweckoptimierten Vektoren dienen, z.B. von Vektoren, die zur Synthese von RNA-Sonden für die *In situ*-Hybridisierung eingesetzt werden (siehe Kapitel 4.1.5).

Bei den für diese Arbeit durchgeführten RT-PCR-Versuchen erfolgte die reverse Transkription durch die Superscript™ III RNase H⁻ Reverse Transkriptase (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers. Es wurden 2 µg Gesamt-RNA und 20 pmol Oligo (dT)₁₆-Primer eingesetzt, so daß nur mRNAs revers transkribiert wurden. Die PCR-Reaktionen erfolgten durch die Hot Star Taq-Polymerase (Qiagen). Standardmäßig wurden für sämtliche PCR-Reaktionen bei einem Gesamtvolumen von 20 µl 1.25 mM MgCl₂, 200 µM dNTP-Mix, 800 nM Primer, 5 µl cDNA und 1 Unit Hot Star Taq-Polymerase eingesetzt. Nach 15 Minuten bei 94°C, erfolgten 35 bis 40 Zyklen mit jeweils 45 Sekunden bei 94°C, mit jeweils 45 Sekunden bei 54°C bis 58°C und mit jeweils einer von der Länge des Amplifikats abhängigen Elongationszeit bei 72°C, abschließend folgten 10 Minuten bei 72°C. Bei einer Amplifikatlänge von 1 kb wurde von einer Elongationszeit von mindestens einer Minute ausgegangen. Die Analyse erfolgte in einem 1.2%igen Agarosegel in TBE. Für nested PCR-Ansätze bzw. zur Sequenzierung und Klonierung wurden die jeweiligen Fragmente unter Verwendung des Qiaex® II Gel Extraction Kits (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert. Falls eine gelelektrophoretische Analyse nicht nötig war, wurden für weitere Anwendungen bestimmte RT-PCR-Produkte mit Hilfe des Qiaquick® PCR Purification Kits (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die für RT-PCR-Versuche verwendeten Primer sind in Kapitel 3.6 aufgelistet.

Für die in Kapitel 5.3 beschriebenen RT-PCR-Versuche wurde Poly A⁺-RNA eingesetzt, die unter Verwendung des Oligotex® Direct mRNA Micro Kits (Qiagen) aus einzelnen Embryonen des Stadiums E8.5 isoliert worden war.

4.1.4 Sequenzierung von PCR-, RT-PCR-Produkten und Plasmiden

Für die Sequenzierung bestimmte PCR-, RT-PCR-Produkte und Plasmide wurden mit Hilfe des Big Dye terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) amplifiziert. Für die Amplifikation wurden in 10 µl Gesamtvolumen 50 bis 100 ng

PCR-Fragment bzw. 250-500 ng Plasmid, 10 pmol Primer und 2 µl Big Dye eingesetzt. Es erfolgten 25 Zyklen mit jeweils 30 Sekunden bei 96°C, mit jeweils 15 Sekunden bei 52°C und mit jeweils 4 Minuten bei 60°C. Zur Aufreinigung wurde das Amplifikat zunächst mit 1/10 Volumen 3 M Na-acetat pH 5.2 und 2.5 Volumen 100% Ethanol gefällt und dann mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet, in 13 µl TSR (Template Suppression Reagent) resuspendiert, 5 Minuten bei 95°C aufgekocht und schließlich auf Eis abgekühlt. Die Sequenzierung erfolgte durch den Abi Prism™310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Perkin Elmer). Zur Analyse der Sequenzen wurde das Programm SeqMan II verwendet.

4.1.5 Herstellung von Plasmiden und RNA-Hybridisierungssonden (Riboprobe)

Um eine geeignete Sonde für die *In situ*-Hybridisierung zu erhalten, wird ein genspezifisches cDNA-Fragment in einen Vektor kloniert, der Promotoren für die SP6-, T7- oder T3-RNA-Polymerase besitzt. Durch Linearisierung dieses Plasmids und die folgende *In vitro*-Transkription mit der entsprechenden RNA-Polymerase wird eine Antisense-RNA synthetisiert, die komplementär zu der Sense-RNA ist, die bei der *In situ*-Hybridisierung im Gewebe lokalisiert werden soll.

Bei der Herstellung der Plasmide wurde zunächst durch RT-PCR ein cDNA-Fragment generiert, das eine geeignete Länge von 400 bis 1200 bp hat, in allen Spleißvarianten des jeweiligen Transkriptes vorhanden ist und außerdem keine Bereiche enthält, die auch in anderen mRNAs vorkommen. So werden eine möglichst gute Hybridisierung gewährleistet sowie unspezifische Bindungen minimiert. Für die RT-PCR wurde der cDNA-Pool eines Organs oder Embryonalstadiums verwendet, der das zu untersuchende Transkript nachweislich enthält. Hierzu wurden Recherchen in EST- und Expressionsdatenbanken durchgeführt. Die Durchführung der RT-PCR ist in Kapitel 4.1.3 erläutert. Das cDNA-Fragment wurde unter Verwendung des Qiaex® II Gel Extraction Kits (Qiagen) bzw. des Qiaquick® PCR Purification Kits (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das cDNA-Fragment wurde gemäß den Angaben des Herstellers in den Vektor pGEM® – T Easy (Promega) ligiert und in den kompetenten *Escherichia coli*-Stamm XL Blue 1

transformiert. Zur Transformation wurde der komplette Ligationsansatz mit 100 µl XL Blue 1 vermischt. Nach 20-minütiger Lagerung auf Eis wurden die Zellen einem 2-minütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach 5-minütiger Lagerung bei Raumtemperatur wurden die Zellen für 30 Minuten in 1 ml LB-Medium bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm pelletiert. Danach wurden die Zellen in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht wurde aus einigen Klonen durch Minipräparation unter Verwendung des Qiaprep® Spin Miniprep Kits (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert und nach einem Kontrollverdau durch Auftrennung in einem 1.2%igen Agarosegel überprüft, ob die Transformation erfolgreich war. Für den Kontrollverdau wurden Restriktionsendonukleasen verwendet, die das cDNA-Insert komplett oder teilweise ausschneiden, so daß ein DNA-Fragment mit einer bestimmten Länge entstehen sollte. Aus einem geeigneten Klon wurde in einer Maxipräparation unter Verwendung des Qiagen® Plasmid Maxi Kits (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers eine ausreichende Menge Plasmid gewonnen. Die Konzentration und Reinheit des Plasmids wurden photometrisch bestimmt. Die Länge und Orientierung des Inserts wurden noch einmal durch gelelektrophoretische Analyse eines Kontrollverdaus sowie durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung des Inserts erfolgte sowohl von der 5'- als auch von der 3'-Seite unter Verwendung der SP6-, T7- bzw. T3-Primer. Vor der *In vitro*-Transkription wurde das Plasmid durch eine Restriktionsendonuklease linearisiert, die einen 5'-Überhang bildet und entweder in der 5'-Multiple Cloning Site des Vektors oder möglichst nah am 5'-Ende des Inserts schneidet. Nach der Elektrophorese wurde das linearisierte Plasmid unter Verwendung des Qiaex® II Gel Extraction Kits (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert. Für die *In vitro*-Transkription wurden pro 20 µl Reaktionsvolumen 1 µg des linearisierten Plasmids, 1 x Transkriptionspuffer, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP, 0.65 mM UTP, 0.35 mM Digoxigenin-UTP, 40 Units RNasin® RNase-Inhibitor (Promega) und 20 Units SP6-, T7- oder T3-RNA-Polymerase (Promega) eingesetzt. Die *In vitro*-Transkription erfolgte für 2 Stunden bei 37°C. Danach wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 2 Units RQ1-DNase (Promega) und einer Inkubation für 30 Minuten bei 37°C abgebaut. Die Fällung der RNA-Sonde erfolgte nach Hinzufügen von 1/10 Volumen 8 M LiCl und 2.5 Volumen 100% Ethanol und

Inkubation für 30 Minuten bei -20°C. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 14000 rpm pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Die Konzentration der RNA-Sonde wurde anhand einer gelelektrophoretischen Analyse grob quantifiziert.

Die für diese Arbeit generierten Plasmide und RNA-Hybridisierungs sonden sind in Kapitel 3.8 aufgeführt.

4.2 Zellbiologische und histologische Methoden

4.2.1 Präparation von Embryonen und Organen

Zur Entnahme von Organen bzw. Embryonen wurden adulte Mäuse durch Genickbruch getötet. Neugeborene Mäuse bis zu einem Alter von 7 Tagen wurden durch Dekaptieren getötet. Organe wurden von Fettgewebe freipräpariert und mit 1 x PBS gewaschen. Bei schwangeren Mäusen wurde der Bauch geöffnet, der die Embryonen enthaltende Uterus wurde herauspräpariert und in eiskaltes 1 x PBS überführt. Die Sektion der Embryonen erfolgte in eiskaltem 1 x PBS. Embryonen der Stadien E4.5 bis E8.5, die für histologische Analysen bestimmt waren, wurden im Uterus belassen, lediglich der Uterus wurde separiert. Embryonen der Stadien E6.5 bis E18.5, die für Whole mount-Analysen verwendet werden sollten, wurden aus Uterus und Deciduum herauspräpariert. Bei Embryonen älter als E7.5 wurden die extraembryonalen Membranen vollständig entfernt. Embryonen älter als E13.5 und Gehirne wurden sagittal halbiert, ebenso wurden andere Organe in kleinere Stücke zerteilt, um ein besseres Eindringen der Lösungen in das Gewebe zu ermöglichen. Sämtliche Embryonen und Organe wurden in ein 10faches Volumen an Fixativ überführt. Embryonen bis zu einem Stadium von E12.5 sowie im Uterus belassene Embryonen wurden für 2 Stunden fixiert, ältere Embryonen und Organe wurden über Nacht fixiert.

Zur Isolierung von Blastozysten wurden die beiden Uterushörner mit dem anhängenden Ovidukt separat präpariert und in M2-Medium (Sigma) überführt. Durch Injektion von M2-Medium in das Infundibulum des Oviduktes wurden die

Blastozysten aus dem Uterus herausgespült. Die Blastozysten wurden dreimal in M2-Medium gespült und dann fotografiert.

4.2.2 Expressionsanalyse durch LacZ-Färbung von Embryonen, Organen und Vibratomschnitten

Bei Mutagenese-Experimenten werden häufig Vektoren verwendet, die das *LacZ*-Reportergen enthalten. Das *LacZ*-Gen kodiert für das bakterielle Enzym β -Galactosidase. Mit Hilfe der LacZ-Färbung kann man die zeitliche und räumliche Expression eines Fusionsproteins aus dem von einem mutierten Gen kodierten Protein(-abschnitt) und der β -Galactosidase in hetero- und homozygoten transgenen, Knock out- und Gene Trap-Tieren untersuchen. Die Expression des Fusionsproteins spiegelt im Allgemeinen die Expression des Wildtyp-Proteins wieder. Allerdings können Transport, intrazelluläre Lokalisation, Sezernierung und Abbau beim Fusionsprotein verändert sein, wenn entsprechende Signalpeptide durch die Mutation verloren gegangen sind.

Die LacZ-Färbung beruht auf der Fähigkeit der β -Galactosidase Galactose von Substraten abzuspalten, an die sie β -D-glykosidisch gebunden sind. Es entstehen detektierbare, farbliche oder fluoreszierende Produkte. Ein häufig verwendetes Substrat ist 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal), das durch β -Galactosidase in das entsprechende Indoxyl-Derivat umgesetzt wird, welches an der Luft zu dem blauen Indigofarbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert wird. Der für diese Redoxreaktion erforderliche Elektronentransfer wird durch Eisenionen verschiedener Oxidationszustände in der Färbelösung ermöglicht. Der entstehende blaue Indigofarbstoff ist in Wasser unlöslich und präzipitiert im Gewebe an der Stelle, wo das Enzym lokalisiert ist, und kann dort mikroskopisch nachgewiesen werden. Bei der LacZ-Färbung können Hintergrundfärbungen auftreten, die durch die Umsetzung des Substrates durch eine endogene β -Galactosidase entstehen. Um diese Hintergrundfärbung zu minimieren, wird die Färbung bei 30°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur ist die Aktivität des endogenen Enzyms äußerst gering, das bakterielle Enzym büßt jedoch nichts an Aktivität ein.

Für die LacZ-Färbung wurden Embryonen und Organe mit LacZ-Fixativ bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Gewebe dreimal für je 30 Minuten (bis E12.5) bzw. 60 Minuten (ab E13.5, Organe) mit LacZ-Waschlösung gewaschen. Für Vibratomschnitte wurden Gehirnhälften und Embryonen nach dem Waschen in Gelatine/Albumin (mit 1/10 Volumen 25% Glutaraldehyd) eingebettet. Am Vibratom wurden 20-50 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Gewebe bzw. Vibratomschnitte wurden in LacZ-Färbelösung gegeben und über Nacht im Dunkeln bei 30°C geschwenkt. Nach der Färbung wurden die Gewebe über Nacht bei 4°C in LacZ-Waschlösung gewaschen. Es folgte eine Nachfixierung mit 4%PFA/PBS über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Gewebe wieder über Nacht bei 4°C mit LacZ-Waschlösung gewaschen. Embryonen ab E9.5 und Organe wurden schrittweise in 70% Ethanol überführt und dann fotografiert. Einige Embryonen wurden weiter in 100% Ethanol überführt und dann durch mehrstündige Lagerung in einem Benzylbenzoat-Benzylalkohol-Gemisch (2:1) aufgeklärt, um tiefer liegende gefärbte Strukturen besser sichtbar zu machen.

4.2.3 Analyse der Bildung von Nervenfasern durch den immunchemischen Nachweis von Neurofilament-Protein

Die Axone von Neuronen enthalten das Neurofilament-Protein. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das Neurofilament-Protein und eines gegen diesen Erst-Antikörper gerichteten Zweit-Antikörpers, an den das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, können das Neurofilament-Protein durch eine Farbreaktion nachgewiesen und so Nervenfasern sichtbar gemacht werden. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert eine Redoxreaktion bei der das Substrat 3',3'-Diaminobenzidin in Gegenwart des Oxidationsmittels H₂O₂ oxidiert wird und ein braunes Präzipitat bildet.

Der Nachweis von Neurofilament-Protein wurde an ganzen Embryonen des Stadiums E12.5 durchgeführt. In 4% PFA/PBS fixierte und in 100% Methanol gelagerte Embryonen wurden zunächst in einer fallenden Methanolreihe (jeweils 20 Minuten in 75%, 50%, 25% Methanol/PBS) rehydriert. Zur Bleichung wurden die Embryonen für 1 Stunde in 6% H₂O₂/PBT gegeben. Nach Waschung mit 1 x PBT wurden die

Embryonen für 30 Minuten mit 10 µg/ml Proteinase K behandelt, um ein Eindringen der Reagenzien bis in die Zellen zu ermöglichen. Danach wurden die Embryonen erst für 5 Minuten mit 1 x PBT gewaschen und dann mit Glutaraldehyd/PFA/PBT für 20 Minuten refixiert. Um unspezifische Bindungen des Anti-Neurofilament-Antikörpers 2H3 (Developmental Studies Hybridoma Bank of Iowa) zu verhindern, wurden die Embryonen vor der Inkubation mit 10% Pferdeserum/PBT über Nacht bei 4°C „vorgeblockt“. Danach erfolgte die Inkubation des 1:900 in 10% Pferdeserum/PBT verdünnten Antikörpers 2H3 für 24 Stunden bei 4°C. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Embryonen bei mehrmaligem Lösungsaustausch einen Tag lang mit 1 x PBT gewaschen. Die Inkubation mit dem Zweit-Antikörper, einem 1:300 in 1 x PBT verdünntem Meerrettich-Peroxidasegekoppelten Anti-Maus-IgG (Vector Laboratories), erfolgte für 24 Stunden bei 4°C. Ungebundener Zweit-Antikörper wurde durch mehrmaliges, insgesamt 24-stündiges Waschen mit 10% Pferdeserum/PBT entfernt. Zur Färbung wurden die Embryonen in eine Lösung mit 0.1 mg DAB/0.5 µl H₂O₂/PBT gegeben. Die Färbung wurde über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Embryonen in einer steigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 90% und zweimal 100% für jeweils mindestens 5 Stunden) dehydriert und dann in einem Benzylbenzoat-Benzylalkohol-Gemisch (2:1) aufgeklärt.

4.2.4 Anatomische Analyse durch Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin/Eosin-Färbung werden auf Gewebeschnitten Zellkerne violett und Cytoplasma rosa gefärbt, so daß man die Struktur von Embryonen, Organen und Geweben gut histologisch analysieren kann.

Nach der Fixierung mit 4% PFA/PBS wurden Embryonen der Stadien E4.5-E9.5 mitsamt Deciduum und Uterus in einer steigenden Ethanolreihe (in 30%, 50%, 70%, 90%, 96% und 100% Ethanol für jeweils 30 Minuten) dehydriert und anschließend in Xylol (zweimal 15 Minuten) aufgeklärt. Zur Paraffineinbettung wurden die Embryonen zunächst in ein Xylol-Paraffin-Gemisch (1:1; 1 Stunde bei 60°C) und dann in Paraffin (über Nacht bei 60°C) überführt. Am Mikrotom wurden 7-10 µm dicke Schnitte angefertigt. Für die Hämatoxylin/Eosin-Färbung wurden die Schnitte in einer

fallenden Ethanolreihe (je zweimal für 2 Minuten in Xylol, 96%, 80%, 50% und 30% Ethanol, einmal 5 Minuten in Leitungswasser) entparaffiniert und rehydriert. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Schnitte zuerst für 10 Minuten in Mayers Hämatoxylin (Sigma-Aldrich) gegeben, danach dreimal kurz mit Leitungswasser gespült, kurz in 100% Ethanol/1.1% HCl getaucht und schließlich 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser differenziert. Zur Färbung des Cytoplasmas wurden die Schnitte für 40 Sekunden in 1%ige Eosin-Färbelösung gegeben und anschließend gleich in 70% Ethanol gespült. Die Schnitte wurden in einer steigenden Ethanolreihe (je zweimal für 2 Minuten in 80% und 96% Ethanol sowie Xylol) dehydriert und schließlich mit Entellan® (Merck) eingedeckelt.

4.2.5 Expressions- und Phänotypanalyse durch *In situ*-Hybridisierung

Bei der *In situ*-Hybridisierung werden Transkripte mittels einer RNA-Hybridisierungssonde direkt im Gewebe nachgewiesen, so daß man ein genaues Bild über das räumliche und zeitliche Expressionsmuster eines Gens erhält.

Bei der Digoxigenin-Methode werden die Hybridmoleküle aus RNA-Probe und der komplementären Ziel-RNA durch ein Konjugat aus Anti-Digoxigenin-Antikörper und Alkalischer Phosphatase nachgewiesen. Der Antikörper bindet an das Digoxigenin der RNA-Proben, die Alkalische Phosphatase katalysiert eine Farbreaktion, bei der 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (X-Phosphat) mit Hilfe des Elektronenakzeptors Nitroblau-Tetrazolium-Salz (NBT) zu einem blau-violetten, unlöslichen Indigofarbstoff umgesetzt wird, welcher die gesuchte zelluläre RNA lokalisiert.

In situ-Hybridisierung wurden an ganzen Embryonen (Whole mounts) der Stadien E6.5 bis E9.5 sowie auf Gewebeschnitten von Embryonen der Stadien E5.5 bis E12.5 durchgeführt. Die Synthese der RNA-Sonden ist in Kapitel 4.1.5 beschrieben, alle verwendeten Sonden sind in Kapitel 3.8 aufgelistet.

Die Embryonen wurden 2 Stunden bei 4°C in 4% PFA/PBS fixiert und danach in einer steigenden Methanolreihe (25%, 50%, 75% Methanol/PBS und 100% Methanol) dehydriert. Bei freipräparierten Embryonen dauerte jeder

Dehydrierungsschritt 10 bis 20 Minuten und bei im Uterus belassenen Embryonen jeweils 30 Minuten. Zur Paraffineinbettung wurden die Präparate zunächst für 2 Stunden in Isopropanol getan, danach in ein Isopropanol-Paraffin-Gemisch (1 Stunde bei 60°C) und schließlich in Paraffin (über Nacht bei 60°C) überführt. Am Mikrotom wurden 7 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt.

4.2.5.1 Whole mount *In situ*-Hybridisierung

Whole mount *In situ*-Hybridisierungen wurden wie folgt durchgeführt:

Die Embryonen wurden in einer fallenden Methanolreihe (100% Methanol, 75%, 50%, 25% Methanol/PBT für jeweils 10 bis 20 Minuten) rehydriert. Zur Bleichung und zur Inhibierung endogener Phosphatase wurden die Embryonen für 1 Stunde in 6% H₂O₂/PBT gegeben. Nach Waschung mit PBT wurden die Embryonen mit 10 µg/ml Proteinase K behandelt, um ein Eindringen der Reagenzien bis in die Zellen zu ermöglichen. Die Dauer der Proteinase K-Behandlung ist von der Größe der Embryonen abhängig. Sie betrug bei malformierten Embryonen und bei Embryonen der Stadien E6.5 bis E8.5 eine Minute, bei Embryonen der Stadien E9.5 fünf Minuten und bei älteren Embryonen zehn Minuten. Danach wurden die Embryonen sofort mit Glutaraldehyd/PFA/PBT für 20 Minuten fixiert. Nach Waschen mit PBT wurden die Embryonen für 2 Stunden bei 65-70°C prähybridisiert. Zur Hybridisierung wurde Digoxigenin-markierte RNA-Sonde zur Prähybridisierungslösung hinzugegeben und über Nacht bei 65-70°C inkubiert. Ungebundene bzw. unspezifisch gebundene Sonde wurde durch Waschen mit Lösung 1 bei 65-70°C, RNase A-Behandlung bei 37°C in Lösung 2 und Waschen mit Lösung 3 bei 65°C wieder entfernt. Um unspezifische Bindungen des Anti-Digoxigenin-Antikörpers (Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragmente) zu verhindern, wurden die Embryonen vor der Inkubation für jeweils 2 Stunden mit 10% Schafserum/TBST „vorgeblockt“ und der Antikörper mit Maus-Embryopuder präabsorbiert. Die Antikörper-Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Embryonen bei mehrmaligem Lösungsaustausch einen Tag lang mit 1 x TBST gewaschen. Um die Färbereaktion vorzubereiten, wurden die Embryonen in NTMT gewaschen. Für die Färbung wurde das BM Purple Substrate (Roche) verwendet. Die Färbung wurde im

Dunkeln durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Embryonen in 4% PFA/PBS nachfixiert.

4.2.5.2 *In situ*-Hybridisierungen auf Paraffinschnitten

Bei *In situ*-Hybridisierungen auf Paraffinschnitten wurde folgendermaßen vorgegangen:

Die Schnitte wurden in einer fallenden Ethanolreihe (zweimal Xylol für jeweils 10 Minuten, 96%, 90%, 70% und 30% Ethanol, 1 x PBS für jeweils 5 Minuten) entparaffiniert, mit 4%PFA/PBS nachfixiert und in 1 x PBS gewaschen. Nach 10-minütiger Inkubation mit 10 µg/ml Proteinase K bei 37°C wurde der Verdau durch den Transfer in 0.2% Glycin/PBS (10 Minuten) abgestoppt und die Schnitte mit 4% PFA/PBS für 10 Minuten nachfixiert. Durch 15-minütige Behandlung mit 0.2 N HCl und 10-minütige Behandlung mit 0.1 M Triethanolamin pH 8.0/0.25% Essigsäureanhydrid wurden die Objekträger für die Hybridisierung vorbereitet. Die Prähybridisierung erfolgte für 2 Stunden bei 67°C. Zur Hybridisierung wurde Digoxigenin-markierte RNA-Sonde zur Prähybridisierungslösung hinzugegeben und über Nacht bei 67°C inkubiert. Durch Posthybridisierungswaschungen mit Lösung 1 bei 67°C, RNase A-Behandlung für 45 Minuten bei 37°C in TNT-Puffer und Waschungen mit Lösung 2 bei 63°C wurde ungebundene bzw. unspezifisch gebundene Sonde entfernt. Zur Vorbereitung der Antikörper-Inkubation wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 Minuten mit Maleinsäurepuffer gewaschen und mit 2% Blockierungslösung 2 Stunden vorblockiert. Der Anti-Digoxigenin-Antikörpers (Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragmente) wurde ebenfalls für 2 Stunden mit 2% Blockierungslösung präabsorbiert und dann direkt für die Inkubation mit den Schnitten eingesetzt. Die Antikörper-Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper wurden die Embryonen bei mehrmaligem Lösungsaustausch für mindestens 5 Stunden mit Maleinsäurepuffer und 1 x TBST gewaschen. Um die Färbereaktion vorzubereiten, wurden die Schnitte in NTMT gewaschen. Für die Färbung wurde das BM Purple Substrate (Roche) verwendet. Die Färbung wurde im Dunkeln durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Gewebeschnitte mit MEMFA nachfixiert, in 1 x PBS gewaschen, bei Bedarf mit Nuclear Fast Red gegengefärbt und in Moviol eingedeckelt.

5 Ergebnisse

5.1 Datenbank-gestützte Analyse der Organisation des murinen *Bptf/Fac1*-Gens

Um die Organisation des murinen *Bptf/Fac1*-Gens zu analysieren, wurden durch Recherchen in cDNA- und genomischen Datenbanken die cDNA-Sequenz sowie die Exon-Intron-Struktur ermittelt. Aus der cDNA-Sequenz wurden die Aminosäuresequenz und daraus folgend funktionelle Domänen des *Bptf/Fac1*-Proteins abgeleitet. Daneben wurde untersucht, ob es in der Maus Isoformen und/oder Spleißvarianten gibt, die eventuell aufgrund einer unterschiedlichen Ausstattung mit DNA-bindenden Motiven, enzymatischen Domänen oder Lokalisierungssignalen Genprodukte mit potentiell unterschiedlichen Funktion bilden.

In NCBI-Datenbanken wurde durch blastn-Suche in der nicht-redundanten (nr) und in der Maus-EST-Datenbank mithilfe der orthologen Sequenzen des Menschen (AB032251 und AY282495) und der Ratte (XM_221050) nach murinen *Bptf/Fac1*-cDNA-Sequenzen gesucht. Für die kurze Isoform *Fac1* wurden die Sequenzen BF180047, BC003956, BC037661, BC046973 gefunden. Für die lange Isoform *Bptf* hingegen wurden anfangs nur EST-Sequenzen gefunden, die bei Vergleich mit der humanen Sequenz nicht die vollständige Sequenz widerspiegeln konnten. Mithilfe der gefundenen *Fac1*-cDNA-Sequenzen konnte der Locus des *Bptf/Fac1*-Gens im Maus-Genom auf Chromosom 11 lokalisiert werden. Durch Vergleich der humanen *BPTF*-cDNA-Sequenzen AB032251 und AY282495 sowie der durch das Programm GNOMON prognostizierten *Bptf*-cDNA-Sequenz XM_221050 von *Rattus norvegicus* - jeweils in die Exonsequenzen aufgeteilt - mit dem ungefähren genomischen *Bptf/Fac1*-Locus der Maus (genomische Sequenz NW_000040) unter Verwendung des Sequenzanalyse-Programms SeqMan II wurde eine Sequenz für die murine *Bptf*-cDNA vorhergesagt. Durch mehrere RT-PCR-Ansätze (verwendete Primer siehe Kapitel 3.6) und Sequenzierung der jeweiligen Amplifikate konnte diese vorhergesagte Sequenz korrigiert und um einige Sequenzbereiche erweitert werden. Demnach besteht die vollständige *Bptf*-cDNA-Sequenz der Maus aus 9420 bp (siehe Anhang 8.1) und wird von 31 Exons gebildet, die einen Locus von ungefähr 100 kb

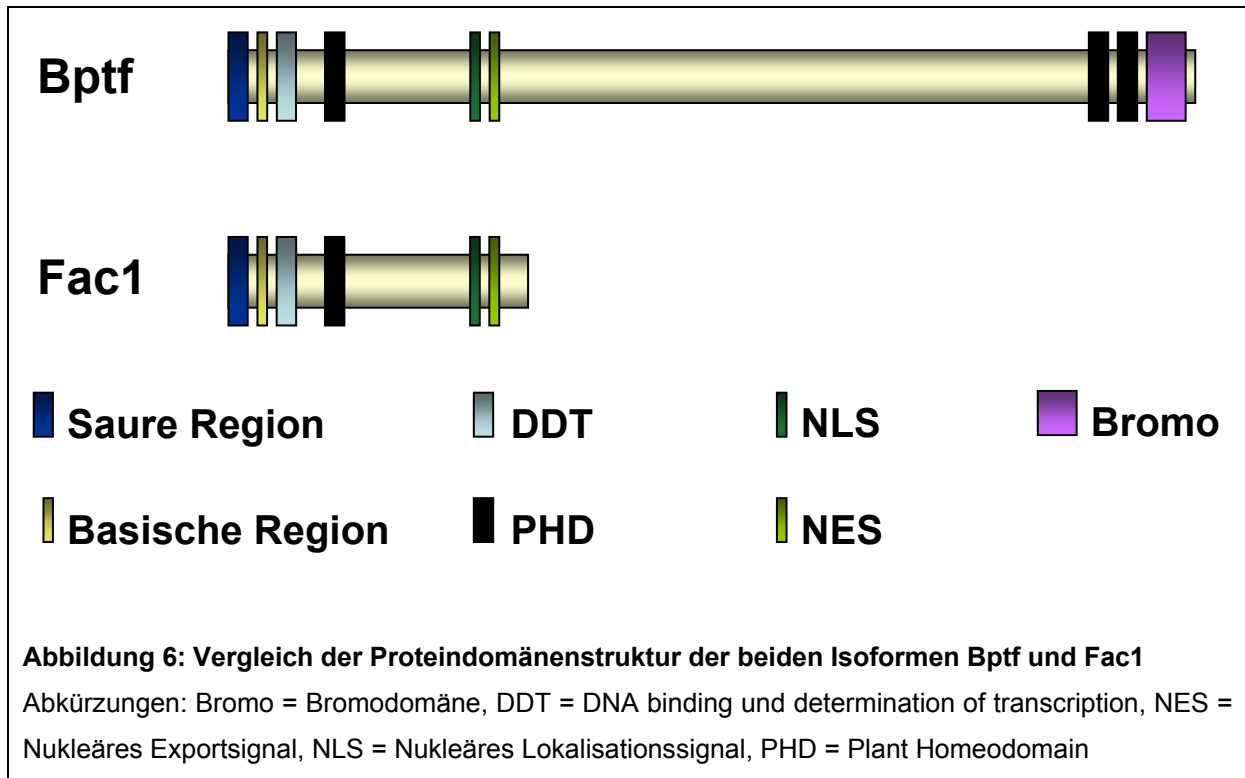
auf Chromosom 11 einnehmen (siehe Anhang 8.2). Entsprechend der bekannten Consensus-Sequenzen AG-Exon-GT für Intron-Exon-Grenzen konnten sämtliche Exon- und Intron-Sequenzen genau ermittelt werden (Tab.1) und durch das Programm SeqMan II im Maus-Genom exakt lokalisiert werden.

Tabelle 1: Die Exons des *Bptf/Fac1*-Gens

Exon	Länge	kodiert für
1	292 bp	Saure Domäne
2	823 bp	Basische Domäne, DDT, N-terminaler PHD
3	224 bp	-
4	210 bp	-
5	189 bp	-
6	186 bp	-
7	188 bp	-
8	356 bp	NLS, NES
9	132 bp	-
10	130 bp	-
11	139 bp	-
12	180 bp	-
13	2308 bp	-
14	125 bp	-
15	129 bp	-
16	151 bp	-
17	43 bp	-
18	247 bp	-
19	152 bp	-
20	109 bp	-
21	218 bp	-
22	235 bp	-
23	464 bp	-
24	83 bp	-
25	226 bp	-
26	344 bp	1. C-terminaler PHD
27	174 bp	1. C-terminaler PHD, 2. C-terminaler PHD
28	193 bp	2. C-terminaler PHD, Bromodomäne
29	85 bp	Bromodomäne
30	187 bp	Bromodomäne
31	898 bp	-

Mithilfe des Programms EditSeq wurde ein Offener Leserahmen ermittelt, der 8469 bp lang ist und von bp 91 bis bp 8559 reicht (siehe Anhang 8.1). Dadurch ergibt sich eine 2822 Aminosäuren lange Proteinsequenz mit einem Molekulargewicht von 311 kDa (siehe Anhang 8.3).

Die murine Bptf-Isoform ist damit um 41 Aminosäuren länger als die humane mit 2781 Aminosäuren und 10 kDa schwerer als das Protein Nurf301 von *Drosophila melanogaster* mit 301 kDa. Die murine *Fac1*-cDNA ist identisch mit den ersten 2655 bp am 5'-Ende der *Bptf*-cDNA und wird von den ersten zehn Exons kodiert. Durch NCBI CDART (Conserved Domain Architecture Retrieval Tool)-Analyse und NCBI CD (Conserved Domain)-Suche sowie durch Vergleich mit dem humanen Protein wurden einige Proteindomänen lokalisiert (Abb. 6). Direkt am N-Terminus befinden sich eine saure und eine basische Domäne, die beide möglicherweise an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind. Ebenfalls am N-Terminus liegen eine DDT (DNA-binding and determination of transcription)-Domäne (Doerks *et al.*, 2001) und ein PHD (Plant homeodomain/Leukemia-associated protein)-Zinkfingermotiv (Aasland *et al.*, 1995; Bienz, 2006), die jeweils als DNA-Bindungsmotive betrachtet werden. Am C-Terminus der Bptf-Isoform sind zwei weitere PHD-Zinkfinger sowie eine Bromodomäne vorhanden. Diese Proteindomänen fehlen in der Fac1-Isoform. Eine Bromodomäne ist eine etwa 110 Aminosäuren lange Sequenz, die mit acetylierten Lysin-Resten interagiert. Diese Domäne findet man in einigen Chromatin-assoziierten Proteinen (Haynes *et al.*, 1992; Zeng und Zhou, 2002). Es wird davon ausgegangen, daß die Bromodomäne durch die Acetylierung von Histonen an der Regulierung der Chromatin-Organisation beteiligt ist. Außerdem findet man ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) und ein nukleäres Exportsignal (NES) an Positionen, die denen im humanen Protein entsprechen. NLS und NES sind Signalsequenzen, die den Import eines Proteins in den Zellkern bzw. den Export aus dem Zellkern vermitteln.



Durch Northern-Hybridisierung mit einer Exon 1/Exon 2-Sonde (siehe Kapitel 4.1.2) konnten *Bptf*- und *Fac1*-Transkripte in mehreren adulten Organen (Gehirn, Herz, Darm, Niere, Leber, Lunge, Muskulatur, Haut, Hoden) nachgewiesen werden (Abb. 7).

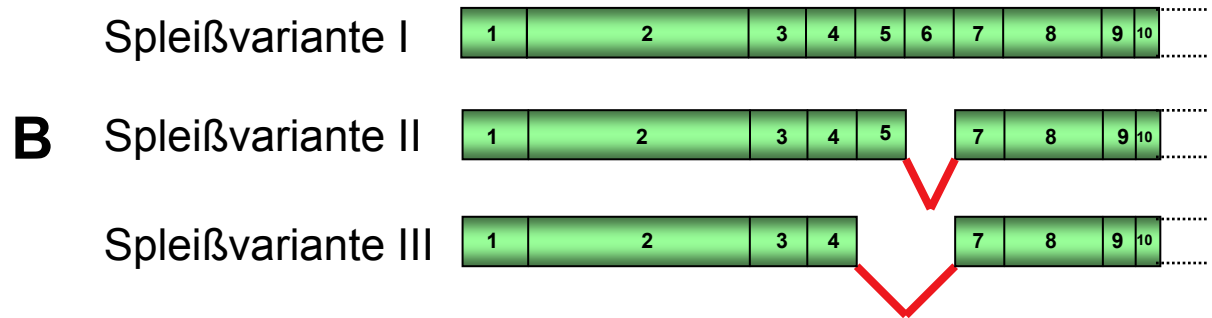


RT-PCR-Analysen zeigen für beide Isoformen alternative Spleißvarianten. *Bptf/Fac1*-Spleißvarianten ohne Exon 5 bzw. Exon 6 sowie ohne Exon 5 und 6 sind in NCBI-Datenbanken beschrieben. In den hier durchgeführten RT-PCR-Versuchen unter Verwendung des Upper-Primers E1-U195 aus Exon 1 und des Lower-Primers E8-L247 aus Exon 8, wurden neben der bezüglich der ersten acht Exons vollständigen Variante (I) auch eine Variante ohne Exon 6 (II) und eine Variante ohne die Exons 5 und 6 (III) nachgewiesen. Die drei Varianten werden in verschiedenen adulten Organen mit unterschiedlicher Präferenz gebildet (Abb. 8). Die Variante I wird im Gehirn am stärksten, in allen anderen untersuchten Organen jedoch am schwächsten exprimiert. Die Variante II ist im Herz und in der Skelettmuskulatur am häufigsten vorhanden, die kürzeste Variante III ist in Niere, Milz, Testis und Thymus dominant. Für die *Bptf*-Isoform konnte im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich ein alternatives Spleißen von Exon 27 gezeigt werden. Exon 27 kodiert für den C-terminalen Bereich des 1. C-terminalen PHD-Zinkfingermotivs und den N-terminalen Bereich des 2. C-terminalen PHD-Zinkfingermotivs (Tab. 1). Durch ein Spleißen von Exon 27 geht allerdings nicht die Sequenzinformation zur Bildung beider, sondern nur eines funktionsfähigen PHD-Zinkfingers verloren. Der von Exon 26 kodierte N-terminale Bereich des 1. C-terminalen PHD-Zinkfingers bildet zusammen mit dem von Exon 28 kodierten C-terminalen Bereich des 2. C-terminalen PHD-Zinkfingers ein neues komplettes PHD-Zinkfingermotiv. Keiner der beschriebenen Spleißvorgänge führt zu einer Verschiebung des Offenen Leserahmens. In Anbetracht der schwachen Signale sowohl im Northern-Blot als auch in den RT-PCR-Analysen scheint die Expression von *Bptf/Fac1* in den adulten Organen der Maus gering zu sein.

Abbildung 8: Alternatives Spleißen von *Bptf/Fac1*-Transkripten

A RT-PCR von Gesamt-RNA aus verschiedenen adulten Organen mit dem Upper-Primer E1-U195 aus Exon 1 und dem Lower-Primer E8-L247 aus Exon 8 ergibt die drei Banden I, II und III. **B** Schematische Darstellung der durch die drei Banden repräsentierten Spleißvarianten.

Abkürzungen: Ge = Gehirn, He = Herz, Ho = Hoden, Le = Leber, Lu = Lunge, Mu = Muskel, Ni = Niere, Pa = Pankreas, Sd = Speicheldrüsen, Th = Thymus



5.2 Die funktionellen Domänen des murinen Bptf/Fac1-Proteins sind hoch konserviert

Um möglicherweise die aus der Literatur (Jordan-Sciutto *et al.*, 1999 I; Haynes *et al.*, 1992; Zeng und Zhou, 2002; Wysocka *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006) bekannten Erkenntnisse über die Funktion orthologer Proteine auf das Bptf/Fac1-Protein von *Mus musculus* übertragen zu können, wurde die murine Aminosäuresequenz mit den bisher bekannten Sequenzen von *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* und *Drosophila melanogaster* mithilfe des Programms MegAlign (Clustal Method) verglichen.

Für die gesamte Aminosäuresequenz des murinen Bptf/Fac1-Proteins ergibt sich eine Identität von 64.6% mit der humanen Sequenz BAA89208, von 68.1% mit der vorhergesagten Sequenz XP_221050 der Ratte und von 22.5% mit der Nurf301-Sequenz AF41792 der Fruchtfliege. Innerhalb der Vertebraten-Proteine zeigen die Sequenzabschnitte eine besonders hohe Übereinstimmung (>93%), denen eine funktionelle Domäne zugeordnet wird (siehe Anhang 8.4):

		Ratte	Mensch	Fliege
Basische Domäne	(10 AS)	100%	100%	70.0%
DDT	(60 AS)	100%	93.3%	76.7%
N-terminaler PHD-Zinkfinger	(48 AS)	100%	100%	72.9%
1. C-terminaler PHD-Zinkfinger	(48 AS)	97.9%	-	66.7%
2. C-terminaler PHD-Zinkfinger	(48 AS)	95.8%	93.8%	81.3%
Bromodomäne	(103 AS)	98.1%	96.1%	80.6%
NLS	(>23 AS)	100%	100%	69.6%
NES	(25 AS)	100%	96.0%	52.0%

Im humanen Protein fehlt der erste C-terminale PHD-Zinkfinger. Neben den beschriebenen Bereichen findet man über die gesamte Proteinsequenz verteilt weitere hoch konservierte Regionen, die wahrscheinlich ebenfalls funktionell bedeutende Domänen bilden, deren Aufgaben aber bisher nicht bekannt sind.

Die für das Bptf-Protein der Ratte kodierende cDNA-Sequenz XM_221050 ist nur eine hypothetische Sequenz, die bisher experimentell nicht bestätigt wurde. Im

Vergleich zur murinen und zur humanen Sequenz hat sie am N-Terminus eine Verlängerung von 380 bis 450 Aminosäuren. In meiner Arbeit wurde durch RT-PCR-Analysen eine murine cDNA-Sequenz nachgewiesen, die der für diese N-terminale Verlängerung kodierenden cDNA-Sequenz der Ratte entspricht. In der Maus ist diese cDNA-Sequenz 1401 bp lang, repräsentiert einen kompletten offenen Leserahmen ohne 5'- und 3'-untranslatierte Regionen und kodiert für 467 Aminosäuren. Die Sequenz ist in 11 Exons organisiert, von denen das letzte nur 8 bp vor dem ersten *Bptf/Fac1*-Exon endet. Allerdings konnte in mehreren RT-PCR-Versuchen keine Verbindung dieser cDNA mit der *Bptf/Fac1*-cDNA gezeigt werden. Bei einer NCBI CDART-Analyse und einer NCBI CD-Suche konnten in der Aminosäuresequenz keine bekannten Motive oder Domänen ausfindig gemacht werden. Ohne die ersten 467 Aminosäuren erhöht sich die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz XP_221050 der Ratte mit der Sequenz der Maus von 68.1% auf 72.6%.

5.3 Charakterisierung der Integration des Gene Trap-Vektors pPT1 β geo in den *Bptf/Fac1*-Locus und Genotypisierung der Mauslinie A012C04

Um die Mauslinie A012C04 zur Phänotypanalyse einer Mutation im *Bptf/Fac1*-Locus nutzen zu können, mußte eine Möglichkeit zur Genotypisierung der Mäuse gefunden werden. Dazu sollte die genaue Position der Vektorintegration bestimmt werden.

Die aus den Sequenzierungsergebnissen der 5'RACE des Fusionstranskriptes durch das Programm SeqMan II abgeleitete Consensussequenz des ES-Zellklons A012C04 (Abb. 9; siehe Anhang 8.5 A - C) deutet auf eine Integration des Gene Trap-Vektors pPT1 β geo in Intron 1 des *Bptf/Fac1*-Gens hin, da die Consensussequenz bei Berücksichtigung von Sequenzierungsfehlern aufgrund einer 92%igen Übereinstimmung Exon1 des *Bptf/Fac1*-Gens zugeordnet werden kann (siehe Anhang 8.5 D, E).

1	CTGGAGTGCT	GCTGTATGTA	CTATGGCTCC	TGAAGCTGCT	TTCCGTGCAG
51	TAACTAGCGT	CGTCGTCGTC	GTCTTCCATC	TCCTCCGGAT	AATCGGAGTC
101	ATCGTCGTCT	TCTTCCATGT	CATCTTCCTC	CTCGT S CTCG	GAATCCTGGG
151	TCTCCTCG S C	GTCGCCATCC	TCCT S CTGCT		

Abbildung 9: Consensussequenz

Sequenzierungsungenauigkeiten in rot

Das Intron1 umfasst 19224 bp und ist das deutlich größte Intron des *Bptf/Fac1*-Gens. Um die Integrationsstelle zu finden, wurde ein Primer-Walking durchgeführt, bei dem durch PCR versucht wurde, aus genomischer DNA einer heterozygoten Maus ein Fragment aus Intron1-Sequenz und Vektorsequenz zu amplifizieren. Heterozygote Nachkommen von HET-WT-Verpaarungen konnten durch eine PCR mit den LacZ-Primern pPT1 β geo-U3849 und pPT1 β geo-L4496 ermittelt werden, da hierbei eine Sequenz des Vektors pPT1 β geo amplifiziert wird. Zum Primer-Walking wurden Upper-Primer aus dem Intron 1 im Abstand von ungefähr 2000 bp sowie Lower-Primer aus dem 5'-Bereich der Vektorsequenz ausgewählt. Die verwendeten Primer sind in Kapitel 3.6 aufgeführt. Bei einer Elongationszeit von maximal zwei Minuten

sollte dabei nur ein Upper-Primer ein Amplifikat bilden. Zur Überprüfung sollten bei einer Kombination dieses Upper-Primers mit verschiedenen Lower-Primern Fragmente gebildet werden, die sich in ihrer Länge entsprechend der Abstände zwischen den Lower-Primern unterscheiden. Die Verifizierung erfolgt durch Sequenzierung der Fragmente.

Diese theoretische Betrachtung erwies sich als zu einfach, da mehrere Upper-Primer Amplifikate bildeten. Auch nach Variierung der Lower-Primer und der Annealing-Temperaturen wurde kein eindeutiges Ergebnis erhalten. Deshalb wurden sämtliche Primerkombinationen parallel mit Wildtyp-DNA und Vektor-DNA durchgeführt, um falsch-positive Amplifikate zu ermitteln. Hierbei bildeten alle Upper-Primer außer I1-U6042 Amplifikate, die mit denen in den Ansätzen mit heterozygoter DNA identisch waren. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß nur Upper-Primer I1-U6042 Amplifikate aus Intron1-Sequenz und Vektorsequenz generiert. Deshalb wurden vom Upper-Primer I1-U6042 aus heterozygoter DNA gebildete Fragmente durch Sequenzierung überprüft. Das Sequenzierungsergebnis zeigt die exakte Integration des Vektors an Position 6628 in Intron 1 (Abb. 10). Außerdem sind die ersten 209 bp am 5'-Ende des Vektors deletiert.

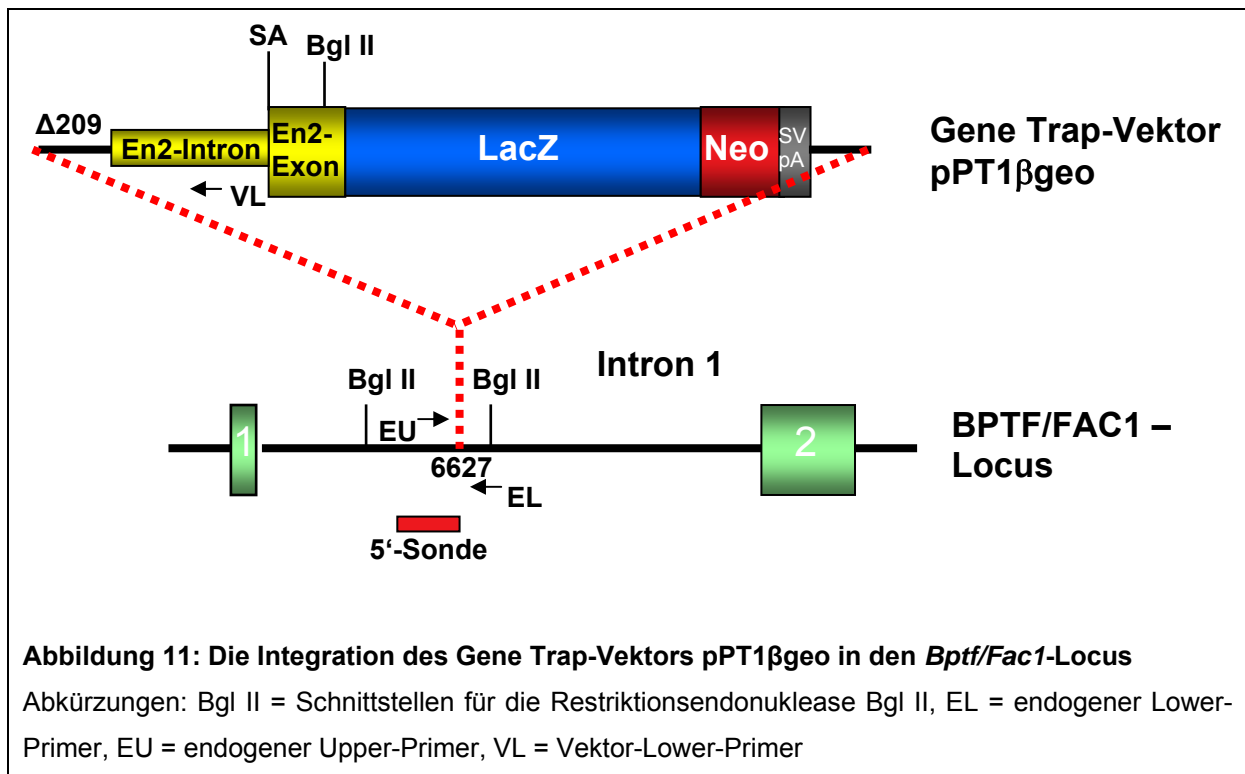
TTAGGGGCTGGTTG_GTGTGGGC_AGAAGCTTC_CTGGACCGGCTTGTA_	Intron1
TTAGGGGCTNNTTGAGTGTGGGCTAGAAGCTTCCTGGACCGGCTTGTA	mutanter Locus
	pPT1βgeo
AGGAGGGAGGCGGGGCAGGAGCAG_CATGATCTC_	Intron1
AGGAGGGAGGCGGGGCAGGAGCAGCATGATCTCTTTATNCCCCGCACCA	mutanter Locus
	pPT1βgeo
TATGCGGCCTCTNCCCGTGGTCTCGCCCTCTTGCTCTAGAAGCCTCNACT	Intron1
GGCCTCT_CCCGTGGTCTCGCCCTCTTGCTCTAGAAGCCTC_ACT	mutanter Locus
210	pPT1βgeo
GGCCAGGTGTANAGCCAGGTCGTGGGTGCCGAGCCCTGSTTCCCTCAT	Intron1
GGCC_AGGTGTA_AG_CCAGGTCGTGGGTGCCGAGCCCTGC_TCCCTCAT	mutanter Locus
	pPT1βgeo

Abbildung 10: Integrationsstelle des Gene Trap-Vektors pPT1 β geo im Intron 1 des *Bptf/Fac1*-Gens

Integration des Vektors pPT1 β geo in Intron 1 nach Nukleotid 6627; Deletion der 5'-liegenden 209 Nucleotide des Vektors pPT1 β geo

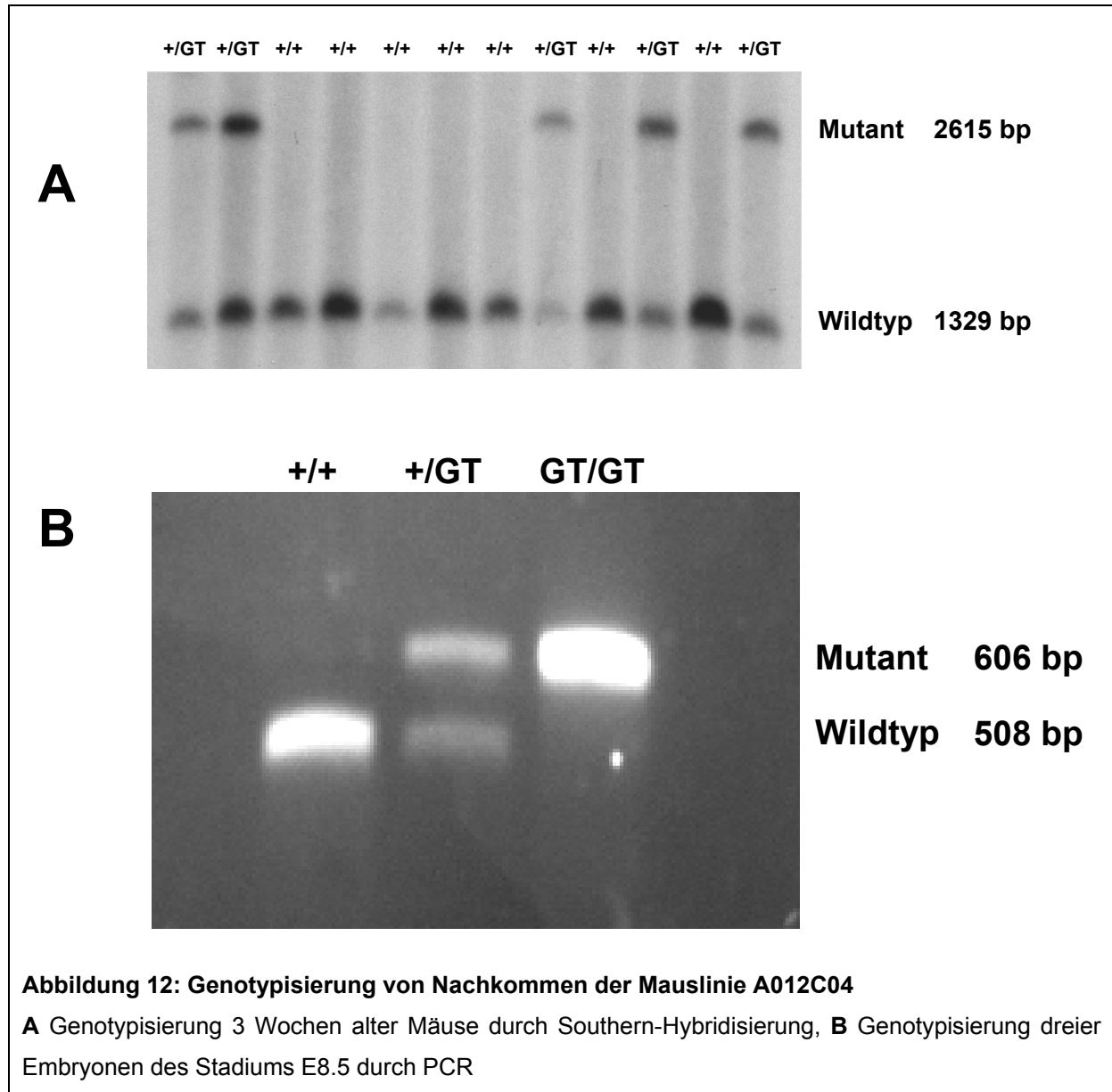
Farbkode: Intron1-Sequenz, 5'-Sequenz des Vektors pPT1 β geo, Intron1 oder pPT1 β geo zugeordnete Sequenz des mutanten Locus, weder Intron1 noch pPT1 β geo zugeordnete Sequenz direkt an der Vektorintegrationsstelle, von der Intron1- bzw. pPT1 β geo-Sequenz abweichende Basen in der Sequenz des mutanten Locus (Sequenzierungsfehler)

Die Integration des Gene Trap-Vektors pPT1 β geo in das Intron 1 des *Bptf/Fac1*-Gens ist schematisch in Abbildung 11 dargestellt.



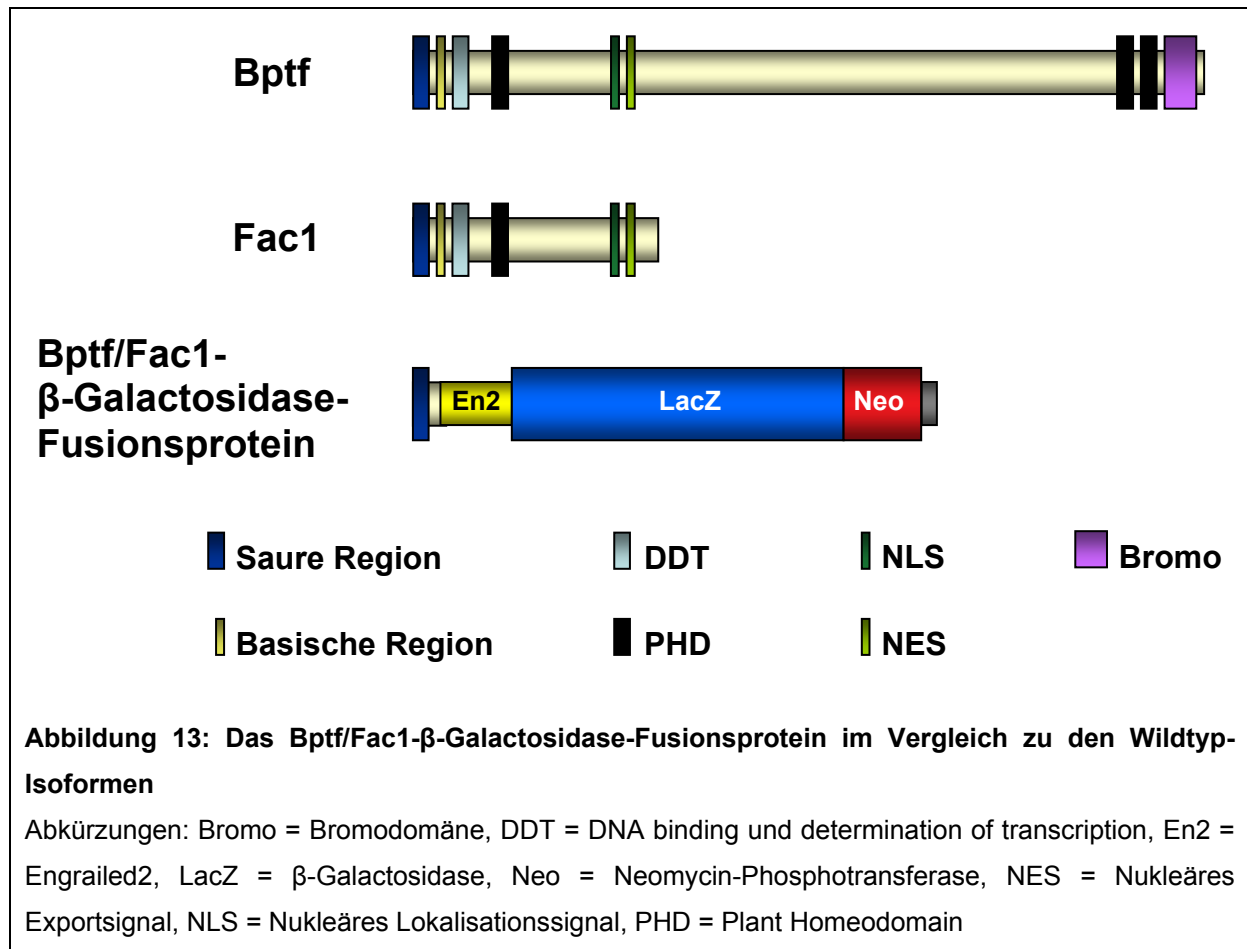
Anhand der nun bekannten Vektorintegrationsstelle im *Bptf/Fac1*-Locus wurden Genotypisierungsstrategien durch Southern-Hybridisierung und PCR etabliert. Zur Southern-Hybridisierung wird genomische DNA mit Bgl II geschnitten und mit einer 750 bp langen Intron 1-Sonde hybridisiert, die direkt 5' von der Vektorintegrationsstelle (nt 5902-6651) liegt (Abb. 11). Das Wildtyp-Allel bildet eine 1329 bp lange Bande und das mutante Allel eine 2615 bp lange Bande (Abb. 12 A). Für die PCR-Genotypisierung werden die drei Primer I1-U6144 (Intron 1-Upper-Primer 5' von der Integrationsstelle), I1-L6651 (Intron 1-Lower-Primer 3' von der

Integrationsstelle) und pPT1 β geo-L331 (Lower-Primer aus dem *Engrailed 2*-Intron des Vektors) verwendet (Abb. 11). I1-U6144 amplifiziert zusammen mit I1-L6651 ein 508 bp langes Fragment des Wildtyp-Allels und zusammen mit pPT1 β geo-L331 ein 606 bp langes Fragment des mutierten Allels (Abb. 12 B).

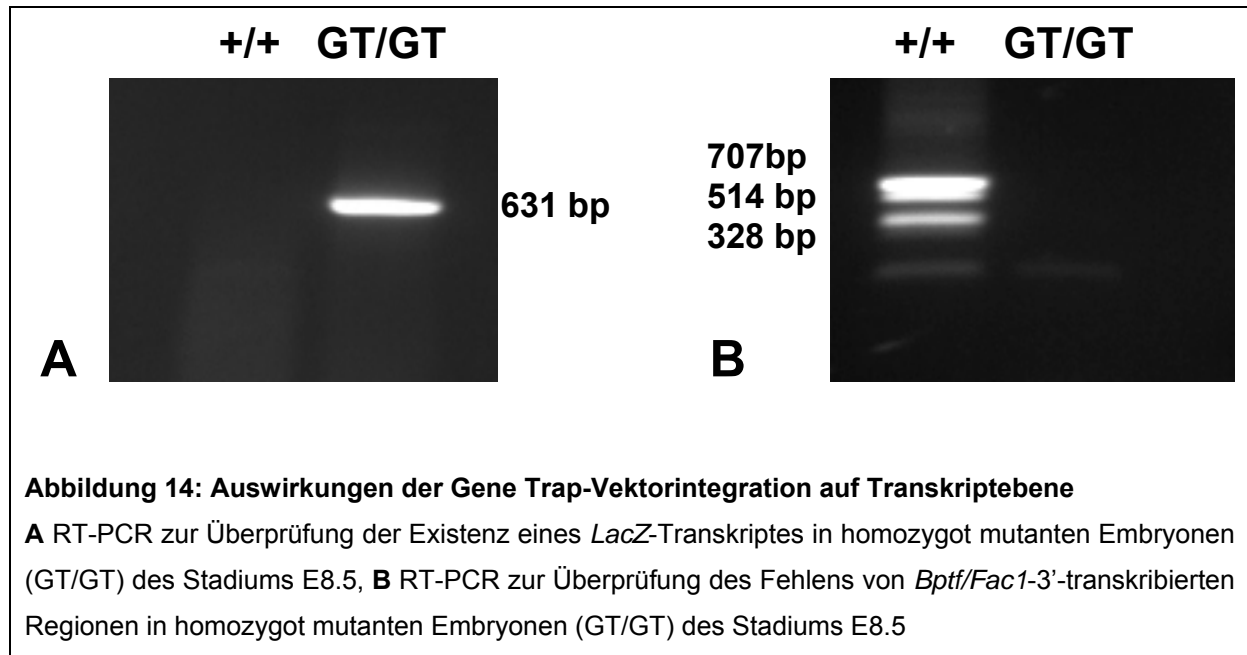


Durch die Integration des Gene Trap-Vektors in Intron1 bildet das mutante *Bptf/Fac1*-Gen demnach ein Fusionstranskript aus Exon 1 sowie den cDNA-Bereichen des Vektors, also dem *Engrailed 2*-Exon, der *LacZ*-cDNA, der *Neo*-cDNA und der SV40-Polyadenylierungsstelle. Daraus resultiert ein Fusionsprotein, das nur die ersten 67 N-terminalen Aminosäuren des Bptf/Fac1-Proteins enthält, die lediglich für die saure

Domäne kodieren (Abb. 13). Das Fusionsprotein besitzt die enzymatische Aktivität der β -Galactosidase und verleiht Resistenz gegen G418.



Die Existenz eines Fusionstranskriptes aus dem Exon 1 des *Bptf/Fac1*-Gens und cDNA-Bereichen des Vektors in homozygot mutanten Embryonen des Stadiums E8.5 wurde in einem RT-PCR-Ansatz unter Verwendung der *LacZ*-Primer pPT1 β geo-U3849 und pPT1 β geo-L4496 in Form eines 631 bp langen Fragmentes der *LacZ*-cDNA nachgewiesen (Abb. 14 A). Das Fehlen von Bereichen der *Bptf/Fac1*-Transkripte, die von in 3'-Richtung von der Vektorintegrationsstelle liegenden Exons kodiert werden, wurde in homozygot mutanten Embryonen des Stadiums E8.5 in einem RT-PCR-Ansatz unter Verwendung des Exon 3/Exon 4-Upper-Primers E3/4-U212 und des Exon 7-Lower-Primers E7-L105 gezeigt. Im Gegensatz zum *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Embryo werden im Wildtyp-Embryo entsprechend der Spleißvorgänge zwischen den Exons 4 und 7 drei Fragmente mit Längen von 703 bp, 514 bp und 328 bp detektiert (Abb. 14 B).



5.4 Expression von *Bptf/Fac1* während der Embryonalentwicklung

Durch LacZ-Färbung bzw. *In situ-Hybridisierung* wurde die embryonale Expression von *Bptf/Fac1* auf Protein- bzw. Transkriptebene analysiert.

Die Expression des Bptf/Fac1- β -Galactosidase-Fusionsproteins wurde in heterozygoten Embryonen der Stadien E7.5 bis E18.5 im gemischten genetischen CD1-Hintergrund durch LacZ-Färbung untersucht.

Das Fusionsprotein wird im Stadium E7.5 im embryonalen Ektoderm exprimiert (Abb. 15 A). An E8.5 ist eine Expression im Neuroepithel der Gehirnblassen und der Neuralfalte sichtbar (Abb. 15 B). An E9.5 ist eine zunächst schwache Expression im distalen Bereich des Herzens (Abb. 15 C) zu sehen, die sich während der weiteren Entwicklung auf die kompletten Herzventrikel und Atria ausdehnt (Abb. 15 D, F, G, N, U). Auch während der Entwicklung des zentralen Nervensystems breitet sich die Expression fortlaufend räumlich aus, beginnend mit der Pons-Region im Mittelhirn und im ventralen Neuralrohr (Abb. 15 D, E, G). An E10.5 wird das Fusionsprotein in der Retina (Abb. 15 E) und an E11.5 in den Trigeminusganglien exprimiert (Abb. 15 K). Bis E16.5 kommt es zu einer Expression im gesamten Gehirn (Abb. 15 I, K, M, S, V) und Rückenmark (Abb. 15 J, K, M, S) sowie außerdem in den dorsalen Spinalganglien (Abb. 15 H, L). Im Verlauf der Organogenese nimmt die Expression in weiteren Geweben und Organen stetig zu. Um E15.5 sieht man eine Expression im olfaktorischen Epithel (Abb. 15 M, P), in der Zunge, der Epiglottis (Abb. 15 M), der Lunge (Abb. 15 O, T), den Nieren, der Muskulatur, den knorpeligen Bandscheiben (Abb. 15 T), der Ohrmuschel, den Augenlidern, den Follikeln der Vibrissen und anderer Haare (Abb. 15 Q) und um E18.5 auch in der Cochlea (Abb. 15 V), dem Magen (Abb. 15 W), der Milz, der Leber und im Thymus. Unmittelbar vor der Geburt an E18.5 ist das Maximum der Expression bezüglich Ausdehnung und Intensität erreicht.

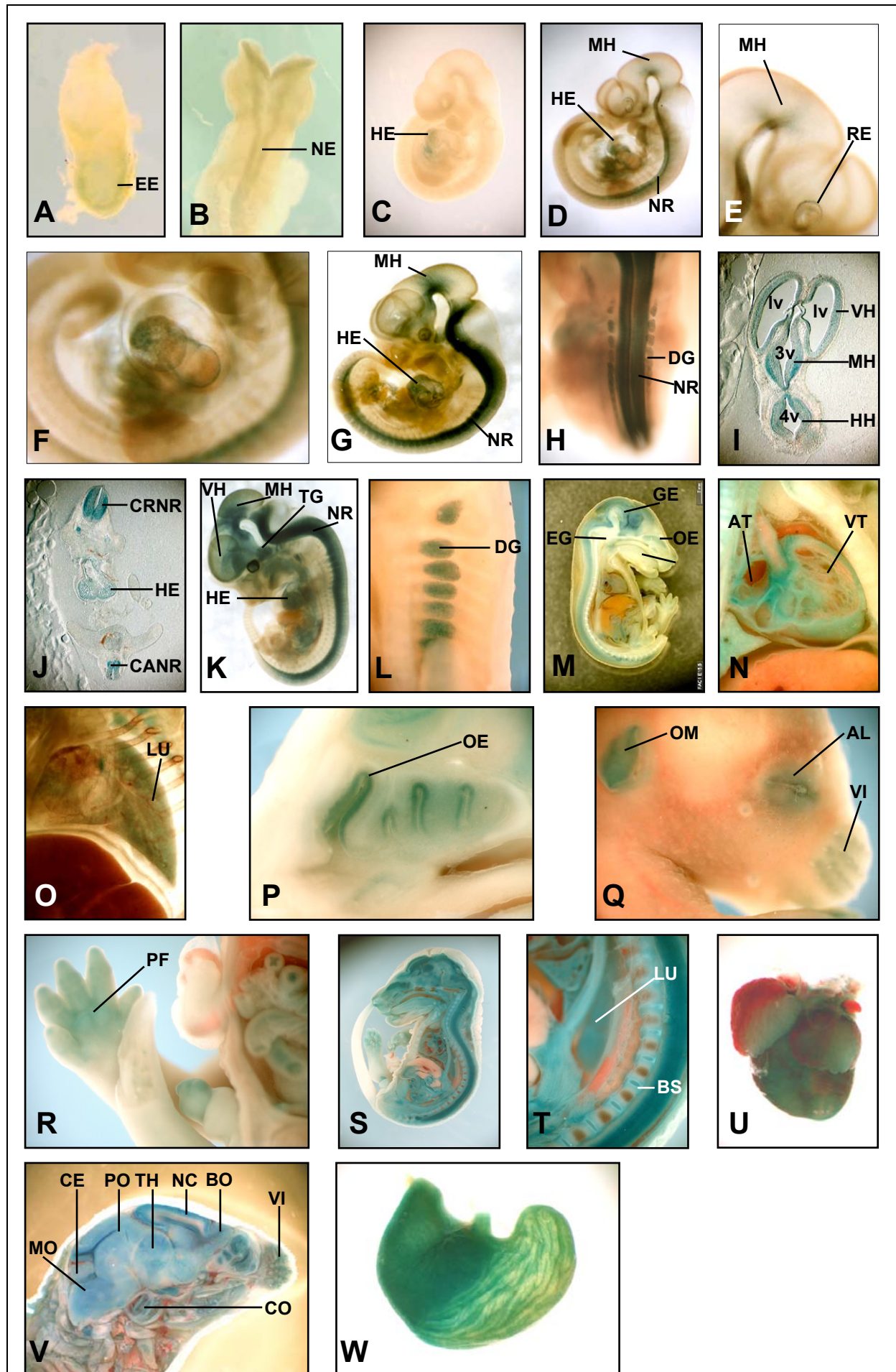


Abbildung 15: Die Expression des Bptf/Fac1-β-Galactosidase-Fusionsproteins während der Embryonalentwicklung

LacZ-Färbung von heterozygoten Embryonen zwischen E7.5 und E8.5; **A** E7.5, **B** E8.5 anteriorer Bereich, **C** E9.5, **D** E10.5 aufgeklart, **E** E10.5 Kopf aufgeklart, **F** E10.5 Herz aufgeklart, **G** E11.5 aufgeklart, **H** E11.5 Dorsalansicht aufgeklart, **I** E11.5 Vibratomschnitt durch den Kopf, **J** E11.5 Vibratomschnitt durch den Rumpf, **K** E12.5 aufgeklart, **L** E14.5 dorsaler Rumpfbereich sagittal halbiert, **M** E15.5 sagittal halbiert, **N** E15.5 Herz angeschnitten, **O** E15.5 Lunge aufgeklart, **P** E15.5 anteriorer Kopfbereich sagittal halbiert, **Q** E15.5 Kopf von außen, **R** E15.5 Hinterextremität, **S** E16.5 sagittal halbiert, **T** E16.5 posteriorer Rumpfbereich sagittal halbiert, **U** E18.5 isoliertes Herz, **V** E18.5 Kopfbereich sagittal halbiert, **W** E18.5 isolierter Magen

Abkürzungen: 3v = 3. (Gehirn-)Ventrikel, 4v = 4. (Gehirn-)Ventrikel, AL = Augenlid, AT = Atrium, BO = Bulbus olfactorius, BS = Bandscheibe, CANR = caudales Neuralrohr, CE = Cerebellum, CO = Cochlea, CRNR = craniales Neuralrohr, DG = dorsales Spinalganglion, EE = embryonales Ektoderm, EG = Epiglottis, GE = Gehirn, HE = Herz, HH = Hinterhirn, Lu = Lunge, lv = lateraler (Gehirn-) Ventrikel, MH = Mittelhirn, MO = Medulla oblongata, NC = Neocortex, NE = Neuroektoderm, NR = Neuralrohr, OE = olfaktorisches Epithel, OM = Ohrmuschel, PF = Pfote, PO = Pons, RE = Retina, TG = Trigeminalganglion, TH = Thalamus, VH = Vorderhirn, VI = Vibrissen, VT = (Herz-)Ventrikel

Zusammenfassend sind die embryonalen Expressionsdomänen in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Zusammenfassung der embryonalen Expressionsdomänen des Bptf/Fac1-β-Galactosidase-Fusionsproteins

(erstmal auftretende Domänen in rot)

Stadium	Expressionsdomänen
E7.5	Embryonales Ektoderm
E8.5	Neuroepithel von Gehirn und Neuralrohr
E9.5	distaler Bereich des Herzventrikels
E10.5	Ventrikel und Atria des Herzens, Mittelhirn, Neuralrohr, Retina
E11.5	Herz, Mittelhirn, Neuralrohr, Retina, Trigeminalganglien, dorsale Spinalganglien
E12.5	Herz, Vorderhirn, Mittelhirn, Hinterhirn, Neuralrohr, Retina, Trigeminalganglien, dorsale Spinalganglien
E13.5	Herz, Vorderhirn, Mittelhirn, Hinterhirn, Neuralrohr, Retina, Trigeminalganglien, dorsale Spinalganglien
E14.5	Herz, Vorderhirn, Mittelhirn, Hinterhirn, Neuralrohr, Retina, Trigeminalganglien, dorsale Spinalganglien
E15.5	Herz, Vorderhirn, Mittelhirn, Hinterhirn, Neuralrohr, Retina, Trigeminalganglien, dorsale Spinalganglien, olfaktorisches Epithel, Zunge, Epiglottis, Lunge, Nieren, Muskulatur, Bandscheiben, Ohrmuscheln, Augenlider, Haarfollikel, Pfoten
E16.5	Herz, Vorderhirn, Mittelhirn, Hinterhirn, Neuralrohr, Retina, Trigeminalganglien, dorsale Spinalganglien, olfaktorisches Epithel, Zunge, Epiglottis, Lunge, Nieren, Muskulatur, Bandscheiben, Ohrmuscheln, Augenlider, Haarfollikel, Pfoten
E18.5	Herz, Vorderhirn, Mittelhirn, Hinterhirn, Neuralrohr, Retina, Trigeminalganglien, dorsale Spinalganglien, olfaktorisches Epithel, Zunge, Epiglottis, Lunge, Nieren, Muskulatur, Bandscheiben, Ohrmuscheln, Augenlider, Haarfollikel, Pfoten, Cochlea, Magen, Milz, Leber, Thymus

Betrachtet man die Expression des Bptf/Fac1- β -Galactosidase-Fusionsproteins in den genetischen Hintergründen der Inzuchtstämme C57BL/6J und 129S2/SvHsd, so ist das Expressionsmuster bis einschließlich E10.5 in heterozygoten Embryonen identisch zu dem im gemischten CD1-Hintergrund. Nachdem die Expressionsdomänen in beiden Inzuchtlinien zunächst in gleicher Weise wie im CD1-Hintergrund angelegt werden, geht die Expression dann aber beginnend um E11.5 zunehmend verloren (Abb. 16 A - C). Deutlich sieht man die Unterschiede an E12.5 (Abb. 16 D - H). Erstens ist die Expression im C57BL/6J- und im 129S2/SvHsd-Hintergrund viel schwächer, zweitens sind die Expressionsdomänen (Haut, Gehirn, Neuralrohr und Herz) in beiden genetischen Hintergründen vielfach unterbrochen und teilweise nur noch punktuell vorhanden (Abb. 16 E - J). An E16.5 ist in den Inzuchtlinien in der Regel keine Expression des Fusionsproteins im gesamten Embryo mehr zu sehen. Im Neuralrohr vollzieht sich das Verschwinden der Expression von anterior nach posterior, und unterschiedlich schnell bezogen auf die rechte und Linke Hälfte des Neuralrohres (Abb. 16 C, 17 B).

Um zu untersuchen, ob die Abnahme der Expression des Fusionsproteins in den Inzuchtstämmen auf eine epigenetische Kontrolle, z.B. durch Methylierung, des maternalen oder paternalen *Bptf/Fac1*-Allels zurückzuführen ist, wurden LacZ-Färbungen an Embryonen des Stadiums E12.5 aus Rückkreuzungen eines heterozygoten Weibchens bzw. Männchens im C57BL/6J-Hintergrund durchgeführt. Ist entweder das maternale oder das paternale Allel inaktiv, dürften alle heterozygoten Nachkommen einer Rückkreuzung des entsprechenden heterozygoten Elternteils kein vollständiges, d.h. ein unterbrochenes oder gar kein Expressionsmuster zeigen. Im entsprechend umgekehrten Fall hingegen sollte das Expressionsmuster vollständig sein.

Die Resultate zeigen aber, daß in beiden Fällen ein im Vergleich zur Expression in der CD1-Linie unvollständiges Muster vorliegt (Abb. 17). Darüber hinaus lassen sich sehr deutliche Expressionsunterschiede zwischen heterozygoten Embryonen desselben Wurfes feststellen (Abb. 17 D - I). Die Abnahme der Expression in den Inzuchtstämmen ist daher weder auf maternale noch auf paternale Prägung zurückzuführen.

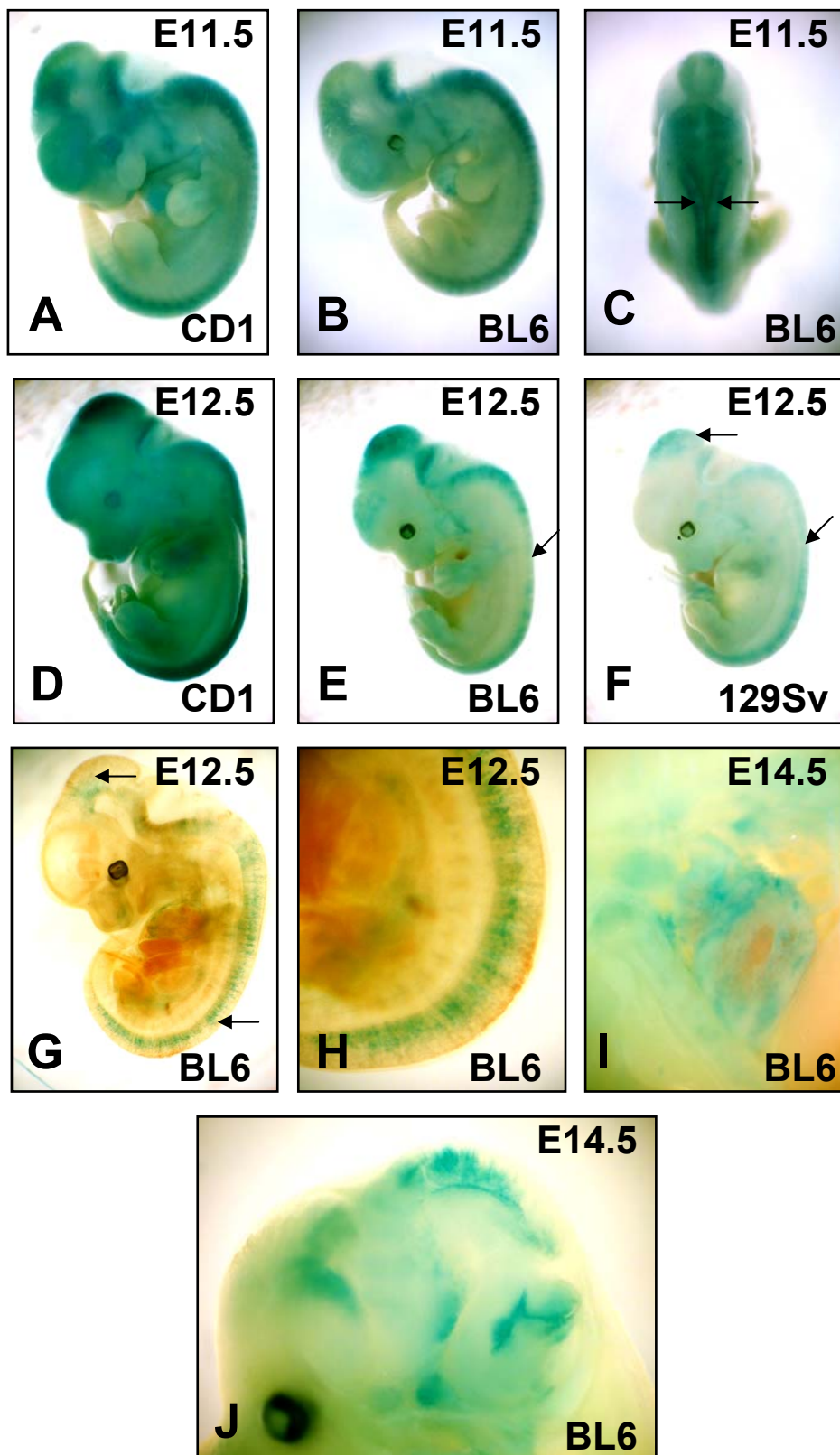


Abbildung 16: Vergleich der Expression des Bptf/Fac1- β -Galactosidase-Fusionsproteins in heterozygoten Embryonen verschiedener genetischer Hintergründe

LacZ-Färbung von heterozygoten Embryonen aus Nachkommenschaften von Verpaarungen heterozygoter Männchen mit heterozygoten Weibchen in den genetischen Hintergründen CD1, C57BL/6J und 129S2/SvHsd; **A** E11.5 CD1, **B** E11.5 BL6, **C** E11.5 BL6 Dorsalansicht, **D** E12.5 CD1, **E** E12.5 BL6, **F** E12.5 129SV, **G** E12.5 BL6 aufgeklart, **H** E12.5 Rumpfansicht des Embryos aus G aufgeklart, **I** E14.5 BL6 Herz angeschnitten, **J** E14.5 BL6 Gehirn angeschnitten; die Pfeile markieren Lücken in den Expressionsdomänen

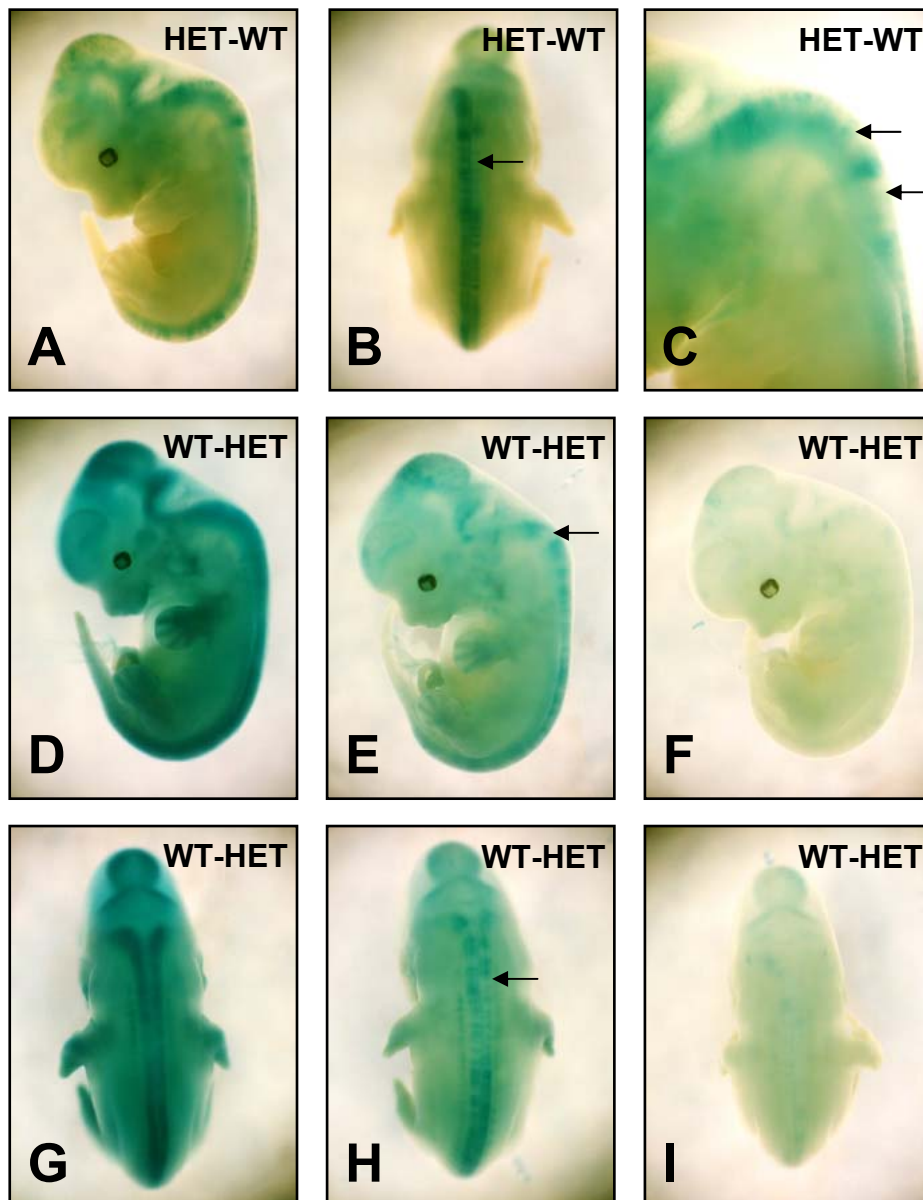


Abbildung 17: Vergleich der Expression des Bptf/Fac1- β -Galactosidase-Fusionsproteins in heterozygoten Embryonen im homogenen genetischen Hintergrund bezüglich der Herkunft des mutierten Allels

LacZ-Färbung von heterozygoten Embryonen aus Nachkommenschaften von Verpaarungen heterozygoter Männchen mit Wildtyp-Weibchen (HET-WT) bzw. aus Nachkommenschaften von Verpaarungen von Wildtyp-Männchen mit heterozygoten Weibchen (WT-HET) an E12.5 im C57BL/6J-Hintergrund; **A** heterozygoter Embryo aus der Nachkommenschaft der Verpaarung eines heterozygoten Männchens mit einem Wildtyp-Weibchen (HET-WT), **B** Dorsalansicht des Embryos aus A, **C** Detailansicht der Region des Hinterhirns und des cranialen Neuralrohrs des Embryos aus A, **D – F** drei verschiedene heterozygote Embryonen aus derselben Nachkommenschaft der Verpaarung eines Wildtyp-Männchens mit einem heterozygoten Weibchen (WT-HET), G – I Dorsalansicht der drei jeweiligen Embryonen aus D – F; die Pfeile markieren Lücken in den Expressionsdomänen

In den genetischen Hintergründen der Inzuchtstämme verläuft der Verlust der Expression so rapide, daß hierfür eine pathologische Ursache wahrscheinlich erscheint, die zum Sterben von Zellen führt, in denen das Fusionsprotein gebildet wird. Aufgrund der frühen und umfassenden Expression des Fusionsproteins im Gehirn und im Neuralrohr, wären dort deshalb Defekte in der Bildung von Neuronen und Axonen in heterozygoten Embryonen der Inzuchtlinien möglich. Um dieses zu überprüfen wurden Position, Verlauf und Länge von Nervenfasern in Wildtyp- und heterozygoten Embryonen des Stadiums E12.5 mit Hilfe eines Neurofilament-Antikörpers verglichen. Dieser Antikörper detektiert eine Vielzahl von Nervenfasern.

Bei der Analyse des durchgeführten Antiköpernachweises wurden in den heterozygoten Embryonen allerdings keine Abweichungen in der Position, im Verlauf oder der Länge der sichtbaren Nervenfasern im Gehirn sowie innerhalb und außerhalb des Neuralrohres festgestellt (Abb. 18). Der Verlust der Expression des Fusionsproteins hat demnach keine Auswirkungen auf die Bildung von Neuronen und Axonen.

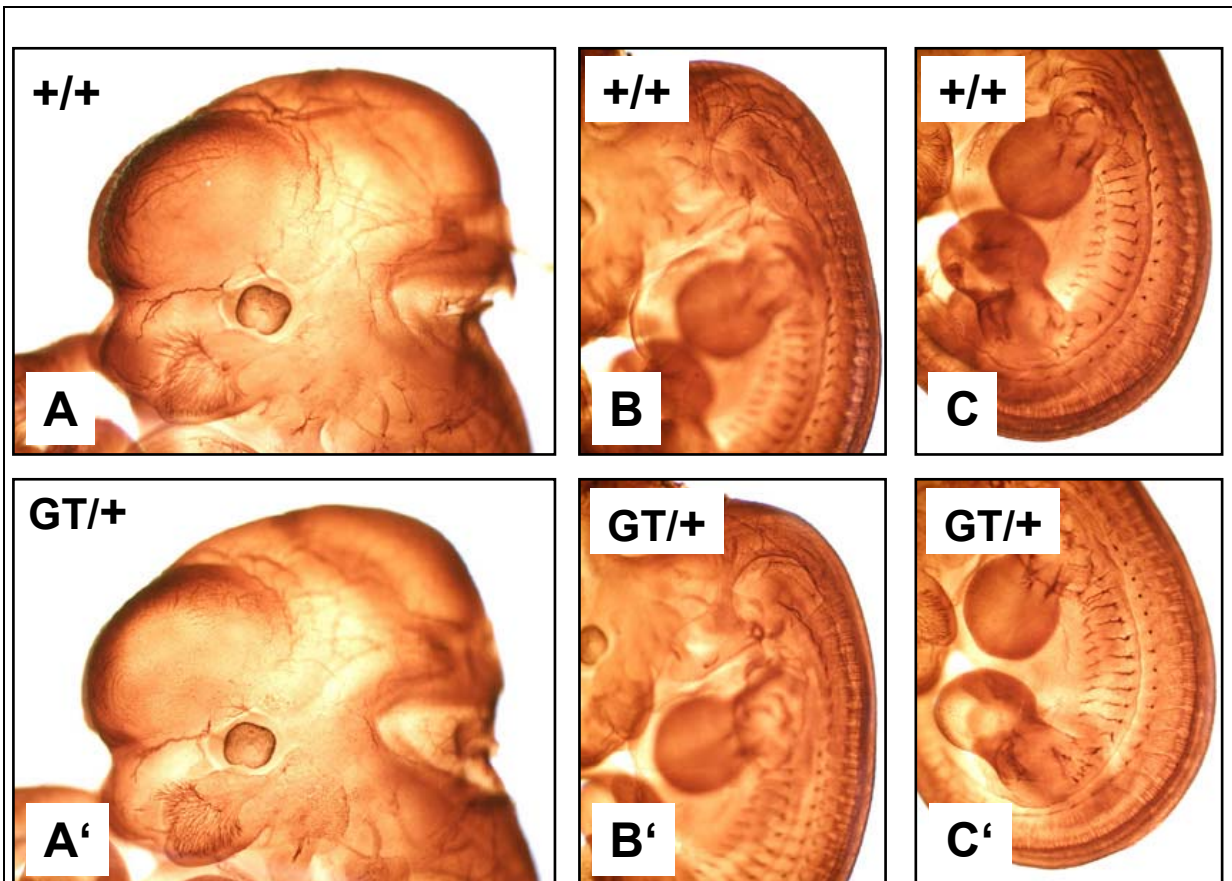


Abbildung 18: Vergleich der Bildung von Nervenfasern in Wildtyp- und heterozygoten Embryonen im homogenen genetischen Hintergrund

Immunfärbung gegen das Neurofilamentprotein an Whole mount-Embryonen aus der Nachkommenschaft der Verpaarung eines heterozygoten Männchens mit einem heterozygoten Weibchen im C57BL/6J-Hintergrund an E12.5; **A - C** Detailansichten eines Wildtyp-Embryos (+/+), **A' - C'** entsprechende Detailansichten eines heterozygoten Embryos (GT/+); **A** und **A'** Kopfbereich mit Nervenfasern im Mittelhirn und im Bereich von Auge und Schnauze, **B** und **B'** anteriorer Rumpfbereich mit Nervenfasern im Halsbereich und im cranialen Neuralrohr, **C** und **C'** posteriorer Rumpfbereich mit Nervenfasern im lateralen Bereich des Neuralrohrs, in der Bauchregion und in den Extremitäten

Um durch *In situ*-Hybridisierung die Expression von *Bptf/Fac1*-Transkripten in Wildtyp-Embryonen der Stadien E5.5 bis E12.5 zu zeigen, wurden zwei genspezifische RNA-Sonden benutzt, die teilweise eine Unterscheidung zwischen den von den beiden Isoformen gebildeten Transkripten zulassen. Eine 5'-Sonde aus einem Bereich des Exons 2 (nt 195 - 958) detektiert sowohl die *Fac1*- als auch die *Bptf*-Isoform. Eine 3'-Sonde (nt 8601 - 9188) zeigt nur *Bptf*-Transkripte an. Somit können Expressionsdomänen ermittelt werden, in denen nur das *Fac1*-Transkript gebildet werden. Denn Zellen, die nur von der 5'-Sonde markiert werden, exprimieren nur *Fac1*. Da die *Fac1*-Isoform identisch mit dem 5'-Bereich der *Bptf*-Isoform ist,

können Zellen und Gewebe, in denen nur die *Bptf*-Isoform vorhanden ist, nicht ermittelt werden. Zellen, die von der 3'-Sonde markiert werden, müssen auch von der 5'-Sonde detektiert werden.

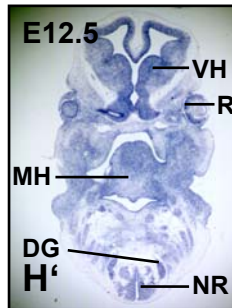
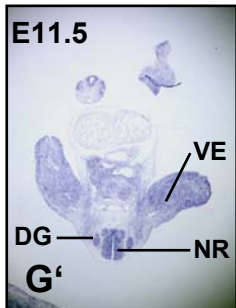
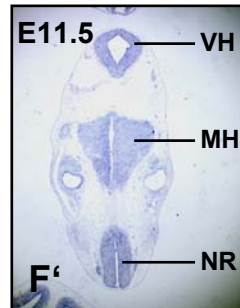
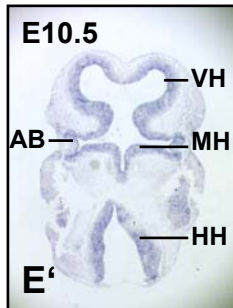
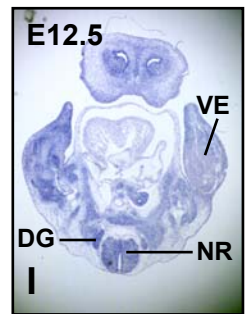
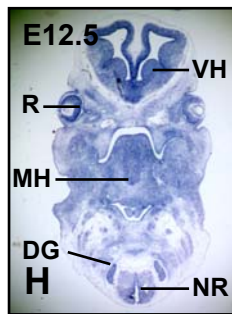
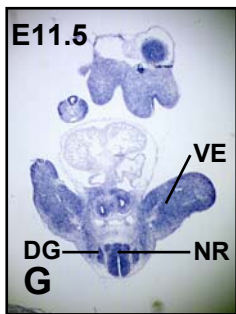
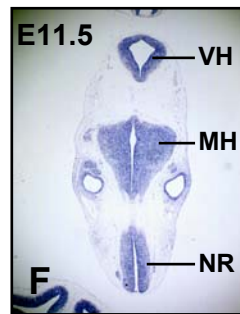
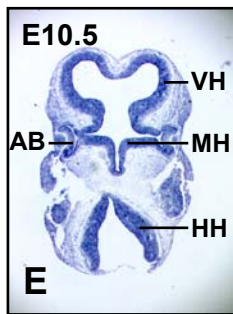
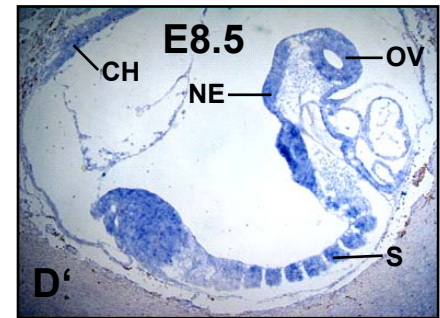
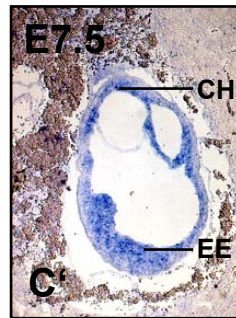
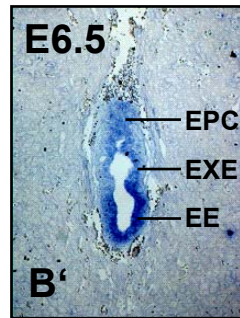
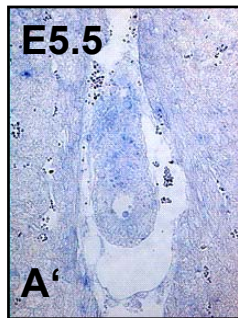
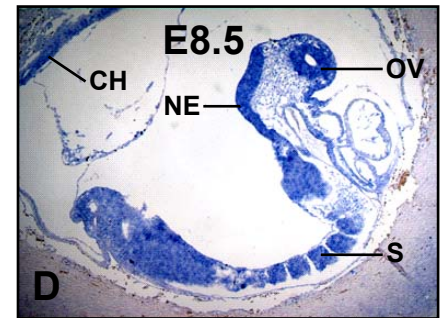
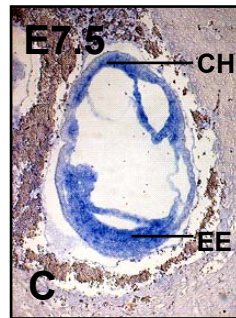
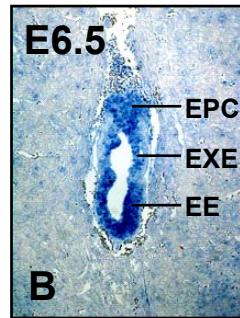
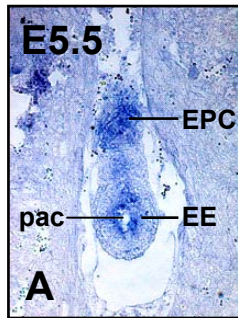
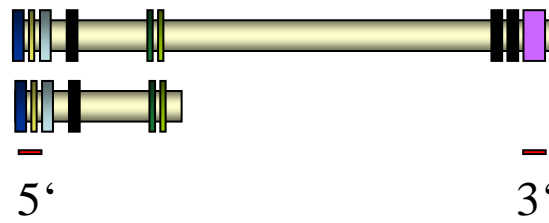
Nach den Ergebnissen der *In situ*-Hybridisierungen mit den beiden Sonden lässt sich nur für *Bptf*-Transkripte ein genaues Expressionsmuster bestimmen, da zwischen E6.5 und E12.5 beide Sonden Transkripte nachweisen. Im Stadium E5.5 jedoch wird nur *Fac1* exprimiert, weil lediglich die 5'-Sonde ein Signal gibt. Demnach wird *Fac1* an E5.5 im ekto-plazentalen Kegel und in dem Bereich des Epiblasts exprimiert, welcher die sich gerade bildende proamniotische Höhle umgibt (Abb. 19 A). An E6.5 ist *Bptf/Fac1* im kompletten embryonalen Ektoderm und im ekto-plazentalen Kegel exprimiert (Abb. 19 B, B'). An E7.5 ist eine Expression im Neuroektoderm, im extraembryonalen Ektoderm und im Chorion zu sehen (Abb. 19 C, C'). Zu Beginn der Neuronalentwicklung an E8.5 ist *Bptf/Fac1* im Neuroepithel aller Gehirnblasen und der Neuralfalte sowie in der Augenblase (optischen Vesikel), den Somiten und auch weiterhin im Chorion vorhanden (Abb. 19 D, D'). Diese neuronalen Expressionsdomänen werden zwischen E9.5 und E12.5 während der Entwicklung von Gehirn, Neuralrohr und Auge auch auf tiefer liegende Schichten ausgedehnt (Abb. 19 E – I, E' – I'), so daß die Expression von *Bptf/Fac1* an E12.5 im zentralen Nervensystem als ubiquitär erscheint. Ab E11.5 ist außerdem eine Expression in den dorsalen Spinalganglien und in mesenchymalen Geweben, z.B. in den sich bildenden Extremitäten zu sehen (Abb. 19 G, G', I, I').

Abbildung 19: Expression von *Bptf/Fac1*-Transkripten zwischen E5.5 und E12.5

In situ-Hybridisierung mit einer 5'- bzw. einer 3'-Sonde (siehe obiges Schema) auf benachbarten 7 µm dicken Paraffinschnitten von Wildtyp-Embryonen; **A – I** 5'-Sonde, **A' – I'** 3'-Sonde; **A** und **A'** E5.5 sagittal, **B** und **B'** E6.5 sagittal, **C** und **C'** E7.5 sagittal, **D** und **D'** E8.5 sagittal; **E** und **E'** E10.5 Kopf auf Höhe der Augen transversal, **F** und **F'** E11.5 Kopf oberhalb der Augen transversal, **G** und **G'** E11.5 Rumpf auf Höhe der Vorderextremitäten transversal, **H** und **H'** E12.5 Kopf auf Höhe der Augen transversal, **I** und **I'** E12.5 Rumpf auf Höhe der Vorderextremitäten transversal

Abkürzungen: AB = Augenblase, CH = Chorion, DG = dorsale Spinalganglien, EE = embryonales Ektoderm, EPC = ekto-plazentaler Kegel, EXE = extraembryonales Ektoderm, HH = Hinterhirn, MH = Mittelhirn, NE = Neuroektoderm, NR = Neuralrohr, OV = optischer Vesikel, pac = proamniotischer Kanal, R = Retina, S = Somite, VE = Vorderextremität, VH = Vorderhirn

Vergrößerungen jeweils 100x



5.5 Expression von *Bptf/Fac1* während der postnatalen Gehirnentwicklung und in anderen adulten Organen

Die Expression des Bptf/Fac1- β -Galactosidase-Fusionsproteins in heterozygoten Mäusen im gemischten genetischen CD1-Hintergrund wurde in verschiedenen Hirnarealen (Bulbus olfactorius, Neocortex, Hippocampus, Cerebellum) zu verschiedenen Zeitpunkten (E16.5, P0, P10 und adult) der postnatalen Neuronalentwicklung untersucht.

Im Stadium E16.5 wird das Fusionsprotein im gesamten Gehirn deutlich exprimiert (Abb. 20 A). Stattdessen ist die Expression im adulten Gehirn herunterreguliert und eine deutliche Expression auf wenige Bereiche wie den Hippocampus und das Cerebellum begrenzt (Abb. 20 B). Die Expressionsdomänen des Bptf/Fac1- β -Galactosidase-Fusionsproteins im adulten Gehirn entsprechen dem bereits (Barak *et al.*, 2003) beschriebenen Muster für *Bptf*-Transkripte (Abb. 20 C).

Eine postnatale Abnahme der Expression wird in den meisten anderen Geweben und Organen festgestellt. Im Herz, im Großteil der Lunge, in der Leber, in der Muskulatur, im Fettgewebe, im Knorpel- und Knochengewebe, im Thymus, in der Medulla und im Cortex der Niere ist entweder keine oder nur eine sehr schwache Expression sichtbar. Eine eindeutige Expression wird nur im Bronchus der Lunge, im Nierenbecken, in der Milz, im Magen, den Hoden, der Prostata und den Koagulationsdrüsen detektiert.

Im Bulbus olfactorius und im Neocortex sowie in vielen anderen Arealen nimmt die Expression während der postnatalen Entwicklung von P0 bis zum adulten Stadium zunehmend ab, während sie in der pyramidalen Zellschicht des Hippocampus und in der granulären Zellschicht des Gyrus dentatus sowie in der granulären Zellschicht des Cerebellums stetig zunimmt (Abb. 21).

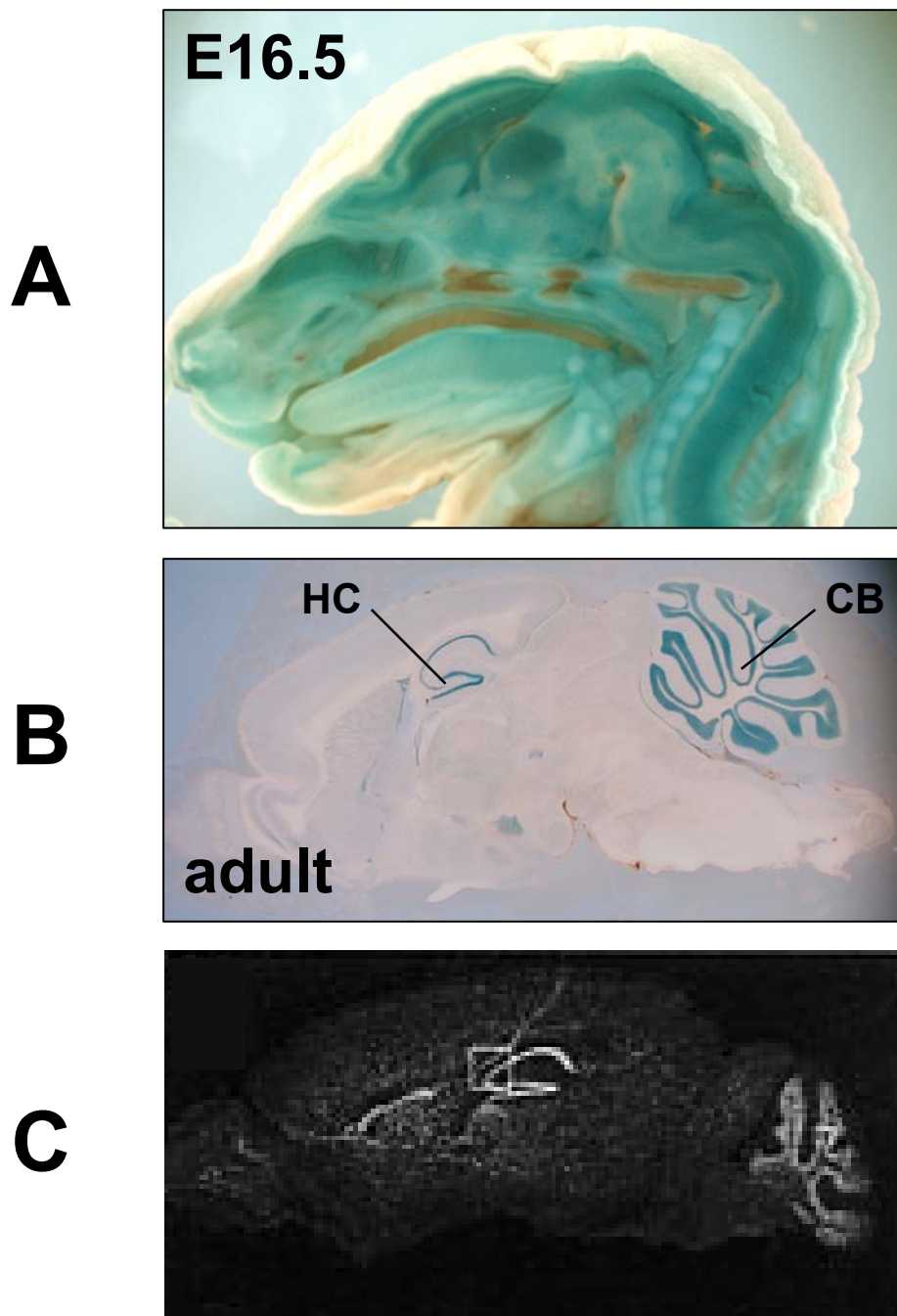
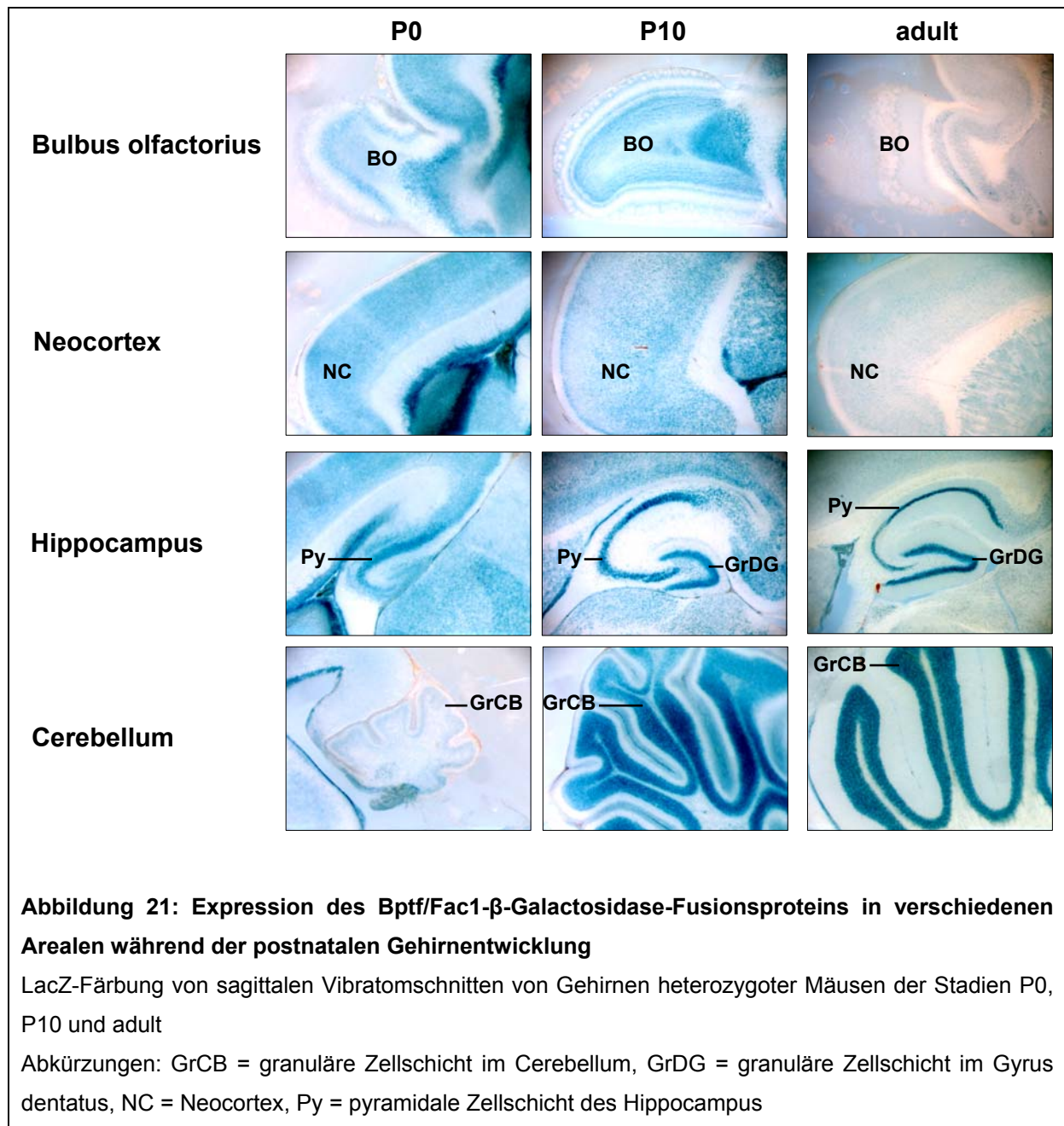


Abbildung 20: Expression des Bptf/Fac1-β-Galactosidase-Fusionsproteins während der Gehirnentwicklung

A LacZ-Färbung im Kopf und Gehirn eines sagittal halbierten heterozygoten Embryos an E16.5; **B** LacZ-Färbung eines Vibratomschnittes vom Gehirn einer adulten heterozygoten Maus; **C** zum Vergleich die Expression von *Bptf*-mRNA im Gehirn einer adulten Maus, dargestellt durch eine radioaktive *In situ*-Hybridisierung eines Gehirnschnittes mit einer *Bptf*-Sonde (aus Barak *et al.*, 2003)
Abkürzungen: CB = Cerebellum, HC = Hippocampus



5.6 Letalität von *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Embryonen

Bei der Genotypisierung von Verpaarungen heterozygoter Weibchen mit heterozygoten Männchen wurden unter insgesamt 96 Nachkommen keine homozygot mutanten (GT/GT) Mäuse gefunden. Da auch keine früh-postnatale Letalität festgestellt worden war, scheint die Gene Trap-Mutation des *Bptf/Fac1*-Gens einen Defekt zu verursachen, der zu einer Letalität während der Embryogenese führt. Deshalb wurden die Genotyp-Verhältnisse in den Nachkommenschaften von Verpaarungen heterozygoter Männchen mit heterozygoten Weibchen im genetischen Hintergrund des Mausstammes C57BL/6J, ab der 7. Generation der Rückkreuzung der Eltern, zu verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung untersucht (Tab. 3).

Tabelle 3: Statistik zur Letalität in den Nachkommenschaften von Verpaarungen heterozygoter Männchen mit heterozygoten Weibchen

Stadium	Individuen ¹	+/+	+ /GT	GT/GT ²	Resorptionen ³
adult	96	42 (43.8%)	54 (57.3%)	0 (0.0%)	-
E11.5	64 (8.0/Wurf)	16 (25.0%)	21 (32.8%)	0 (0.0%)	27 (42.2%)
E10.5	52 (7.4/Wurf)	12 (23.1%)	25 (48.1%)	2 (3.8%)	13 (25.0%)
E9.5	49 (7.0/Wurf)	12 (24.5%)	32 (65.3%)	3 (6.1%)	2 (4.1%)
E8.5	88 (8.8/Wurf)	15 (16.9%)	50 (56.2%)	17 (19.1%)	6 (6.7%)

¹ Individuen bei Embryonalstadien = Deciduen

² alle GT/GT sind malformiert (deutlich kleiner, runde bis konische Form, entwicklungsverzögert)

³ Resorptionen sind erkennbar durch ein kleineres Deciduum und nekrotisches Gewebe

Im zuerst untersuchten Stadium E8.5 waren von 88 Embryonen 17 (19.1%) homozygot (GT/GT) und weitere 6 (6.7%) Embryonen waren bereits resorbiert. Diese beiden Gruppen machen zusammen 25.8% aller Individuen in diesem Stadium aus. Resorptionen können aufgrund der Degradation des Gewebes und der DNA sowie aufgrund der Kontamination mit maternalem Blut nicht zuverlässig genotypisiert werden. Sie sind gekennzeichnet durch ein kleineres Deciduum mit braunem, nekrotischen Gewebe. Alle *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Embryonen waren im Stadium E8.5 deutlich kleiner und hatten eine konische oder rundliche Form. Sie waren

offensichtlich verzögert in ihrer Entwicklung, eine anterior-posteriore Achse schien nicht festgelegt worden zu sein. Im Gegensatz zur klaren abnormalen Morphologie der *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen waren deren Decidua von denen normal entwickelter Embryonen nicht zu unterscheiden (Abb. 22). Im Stadium E9.5 wurden drei (6.1%) und an E10.5 wurden nur zwei (3.8%) *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen gefunden, die zudem alle abnormal entwickelt waren. Die Morphologie dieser Individuen ähnelt der, die für *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen im Stadium E8.5 charakteristisch ist, die *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen im Stadium E9.5 sind nur etwas größer. Neben diesen fünf Embryonen wurden in den Stadien E9.5 und E10.5 keine weiteren Individuen mit offensichtlichen Entwicklungsdefekten registriert. Jedoch betrug an E10.5 der Anteil der Resorptionen 25.0%. An E11.5 waren keine *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen mehr vorhanden, wohingegen 42.2% aller Embryonen in diesem Stadium resorbiert waren.

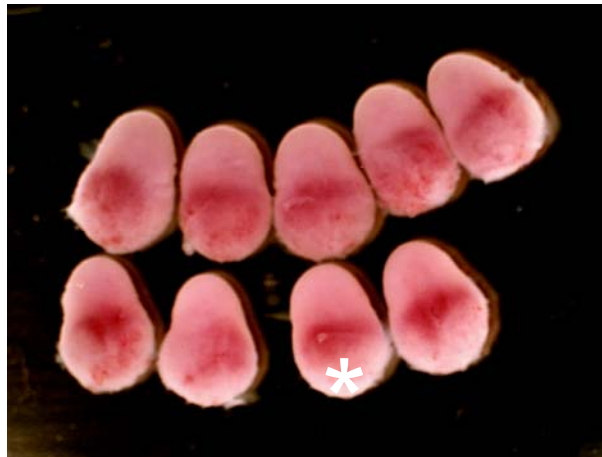


Abbildung 22: Die Deciduen einer Nachkommenschaft der Verpaarung eines heterozygoten Männchens mit einem heterozygoten Weibchen an E8.5

Das Deciduum des einzigen *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryos ist durch einen Stern markiert

Diese Statistik zeigt, daß homozygot mutante Embryonen zwischen E8.5 und E10.5 absterben. Bereits an E11.5 sind keine *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen mehr vorhanden.

5.7 Morphologische und anatomische Defekte während der frühen Postimplantationsentwicklung in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen

Die Morphologie von *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen wurde vom Morula- bzw. Blastozysten-Stadium bis zum finalen Stadium ihrer Entwicklung betrachtet. Dazu wurden die Nachkommenschaften von Verpaarungen heterozygoter Männchen mit heterozygoten Weibchen im gemischten genetischen CD1-Hintergrund aus dem Eileiter bzw. dem Uterus und dem Deciduum isoliert.

Die Entwicklung von *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen verläuft bis zum Stadium der expandierten Blastozyste (E3.5) anscheinend normal, da im Vergleich zu Wildtyp-Blastozysten keine morphologischen Unterschiede sichtbar sind (Abb. 23 A, B). Zona pellucida, Trophektoderm und innere Zellmasse sind klar zu erkennen.

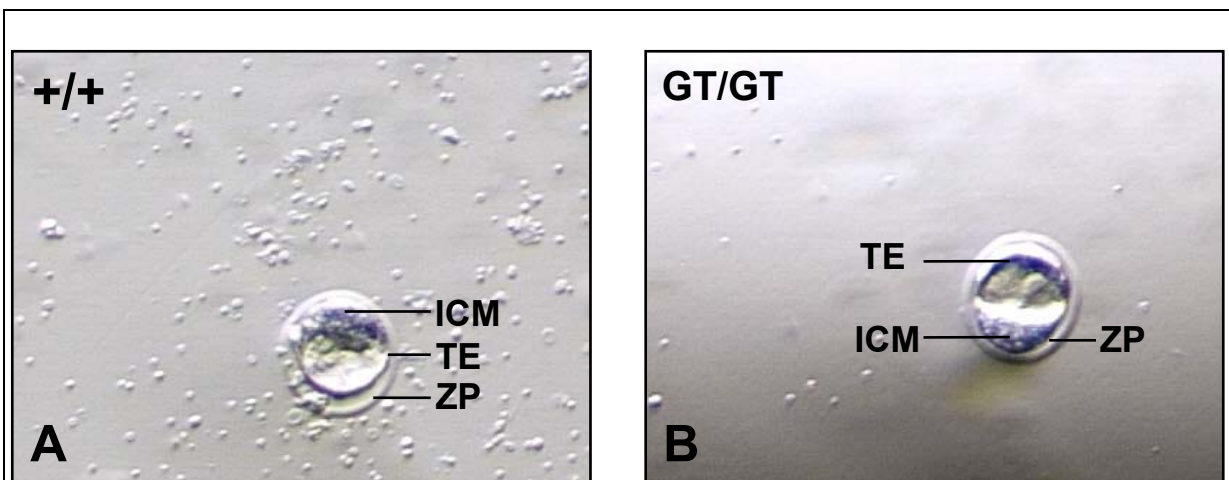


Abbildung 23: Morphologie von Wildtyp-Blastozysten und *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Blastozysten (E3.5)

A Wildtyp-Blastozyste, **B** *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Blastozyste

Abkürzungen: ICM = innere Zellmasse, TE = Trophektoderm, ZP = Zona pellucida

Nach der Implantation in den Uterus allerdings weicht die Morphogenese der *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen vom normalen Verlauf ab. An E6.5 sind *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen zwar entlang der proximodistalen Achse elongiert, allerdings sind sie bereits merklich kleiner als Wildtyp-Embryonen (Abb. 24 A). Bis E9.5 nimmt die Größe der *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen zwar zu, jedoch in einem viel geringeren Maße als in Wildtyp-Embryonen, so daß der Größenunterschied zwischen beiden Gruppen immer deutlicher wird (Abb. 24 A - D). Die morphologische Betrachtung der

Bptf/Fac1^{GT/GT}-Embryonen ergibt keine Hinweise auf die Bildung einer anterior-posterioren Körperachse, etwa in Form von Kopf- oder Schwanzstrukturen bzw. in Form von Einstülpungen auszumachen. Extraembryonale Gewebe wie Fruchtblase und chorio-allantoische Plazenta sind in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen der Stadien E8.5 und E9.5 nicht vorhanden (Abb. 24 C, D). Ebenso sind keine Kopf- und Mittellinienstrukturen (Neuralrohr, Notochord, Darm) und auch keine Somiten erkennbar. Bis E8.5 haben die meisten *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen eine zylindrische Form ähnlich eines normal entwickelten Embryos des Eizylinder- oder frühen Gastrula-Stadiums (E5.5-E7.0), dann aber entwickeln sie eine mehr rundliche Form (Abb. 24 D). Diese Änderung der Morphologie tritt bei einigen *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen schon um E6.5 ein. LacZ-Färbungen zeigen die Expression des *Bptf/Fac1*- β -Galactosidase-Fusionsproteins im embryonalen Ektoderm von homozygot mutanten Embryonen der Stadien E6.5 bis E9.5 (Abb. 24 A - D). In den Stadien E8.5 und E9.5 ist das Fusionsprotein außerdem auch in extraembryonalen Geweben exprimiert (Pfeile in Abb. 24 C, D).

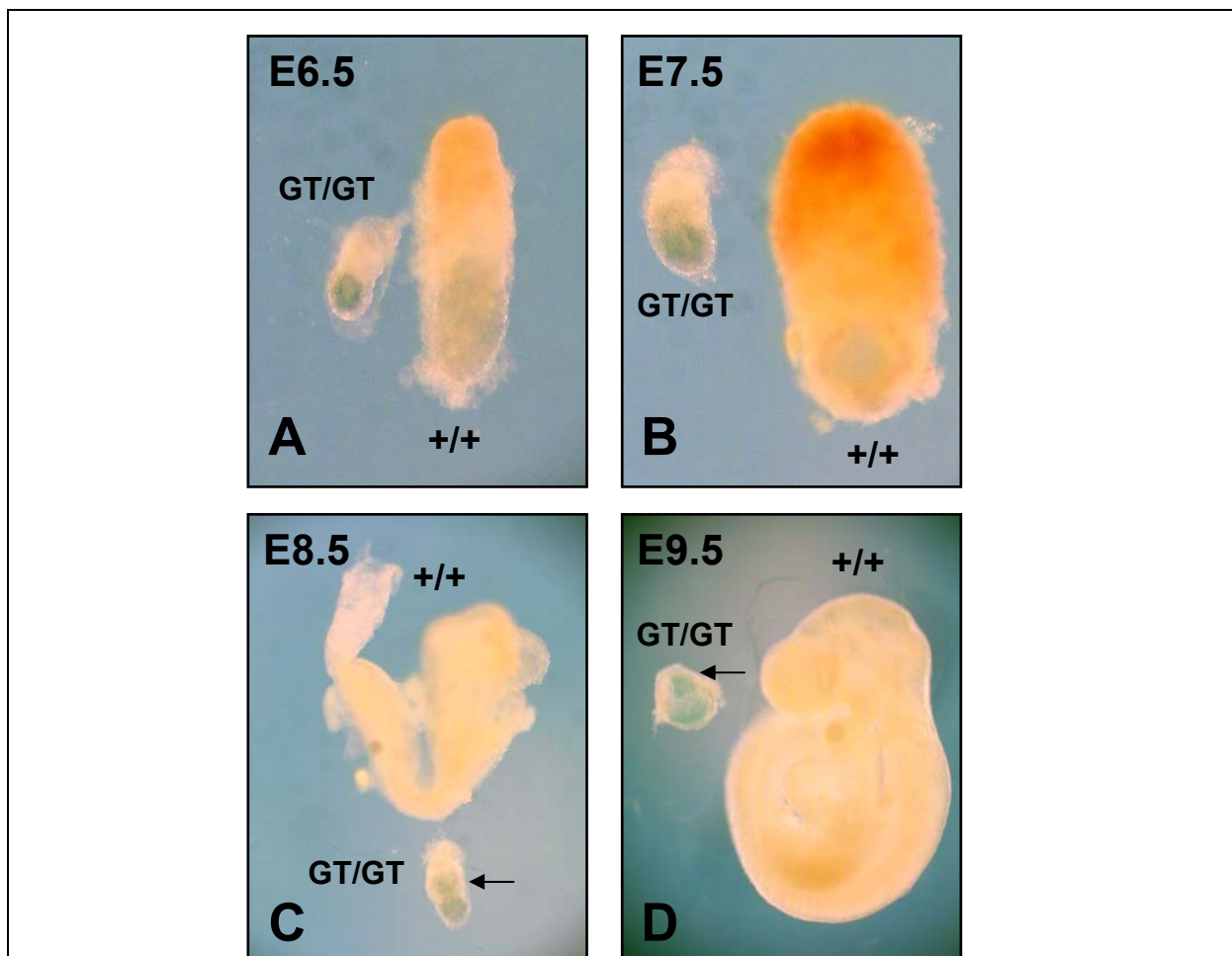


Abbildung 24: Morphologie von *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen desselben Wurfes

LacZ-Färbung von aus dem Deciduum herauspräparierten Wildtyp-Embryonen (+/+) und *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen (GT/GT) jeweils derselben Nachkommenschaft einer Verpaarung eines heterozygoten Männchens mit einem heterozygoten Weibchen der Stadien E6.5 bis E9.5; **A** E6.5, **B** E7.5, **C** E8.5, **D** E9.5; Die Pfeile zeigen eine Expression des *Bptf/Fac1*- β -Galactosidase-Fusionsproteins in extraembryonalem Gewebe

Anatomische Untersuchungen an Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Paraffinschnitten geben einen genaueren Einblick in den Defekt während der frühen Postimplantationsentwicklung. Schon an E5.5 ist die proximodistale Achse in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen ($n = 10 \Rightarrow 26.3\%$) verkürzt. Dieses ist auf den reduzierten Umfang des extraembryonalen Gewebes (extraembryonales Ektoderm, ekto-plazentaler Kegel) zurückzuführen (Abb. 25 A'), das normalerweise durch hohe Proliferationsraten die charakteristische Form des Eizylinder-Embryos hervorruft (Abb. 25 A). Die Zellmorphologien des Epiblasts (embryonalen Ektoderms) und des visceralen (primitiven) Endoderms sind normal. Allerdings ist der Umfang des Epiblasts ebenfalls reduziert, wenn auch in deutlich geringerem Maße als der Umfang des extraembryonalen Gewebes. Während der folgenden Entwicklung verlängert sich zwar die proximodistale Achse und es bilden sich dem Anschein der Zellmorphologien nach auch proximale extraembryonale Gewebe wie extraembryonales Ektoderm und ekto-plazentaler Kegel, aber der Umfang dieser, besonders der des ekto-plazentalen Kegels, bleibt reduziert (Abb. 25 B', C', D'; bei E6.5: $n = 24 \Rightarrow 22.6\%$). Auch Wachstum und Differenzierung des embryonalen Ektoderms und des visceralen Endoderms verlangsamen sich im folgenden Verlauf der Entwicklung. So ähneln embryonales und extraembryonales Ektoderm sowie viscerales Endoderm eines *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryos des Stadiums E7.5 denen eines normal entwickelten Embryos des Stadiums E6.5. Während der normalen Entwicklung werden diese Zellschichten zwischen E6.5 und E7.5 dünner (Abb. 25 B, C), bei *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen geschieht dieses jedoch nicht (Abb. 25 B', C'). Die Entwicklung des ekto-plazentalen Kegels und die Differenzierung zu sekundären Riesenzellen sind allerdings noch wesentlich stärker verzögert. Selbst an E7.5 ist nur eine sehr kleine Population an Zellen mit der Morphologie von Trophoblastzellen an der proximalen Spitze eines *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryos zu erkennen (Abb. 25 C'). In *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen des Stadiums E7.5 sind mesodermale Zellen anhand ihrer

Morphologie nachweisbar (Abb. 25 C', Abb. 26). Dieses weist darauf hin, daß homozygot mutante Embryonen die Gastrulation durchführen können. An E8.5 kann man in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen aufgrund des Fehlens oder der fehlenden klaren Abgrenzung von spezifischen Strukturen wie Kopffalte, Primitivstreifen und Schwanz keine eindeutige anterior-posteriore Achse festlegen, obwohl die Anzahl der mesodermalen Zellen zugenommen hat (Abb. 25 D'). Allerdings haben die *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen zu diesem Zeitpunkt zwei oder sogar drei Höhlen gebildet, die in Anbetracht ihrer Position durchaus der amniotischen, der exocoelomische und der ekto-plazentalen Höhle in einem normal entwickelten Embryo des Stadiums E7.5 entsprechen (Abb. 25 D').

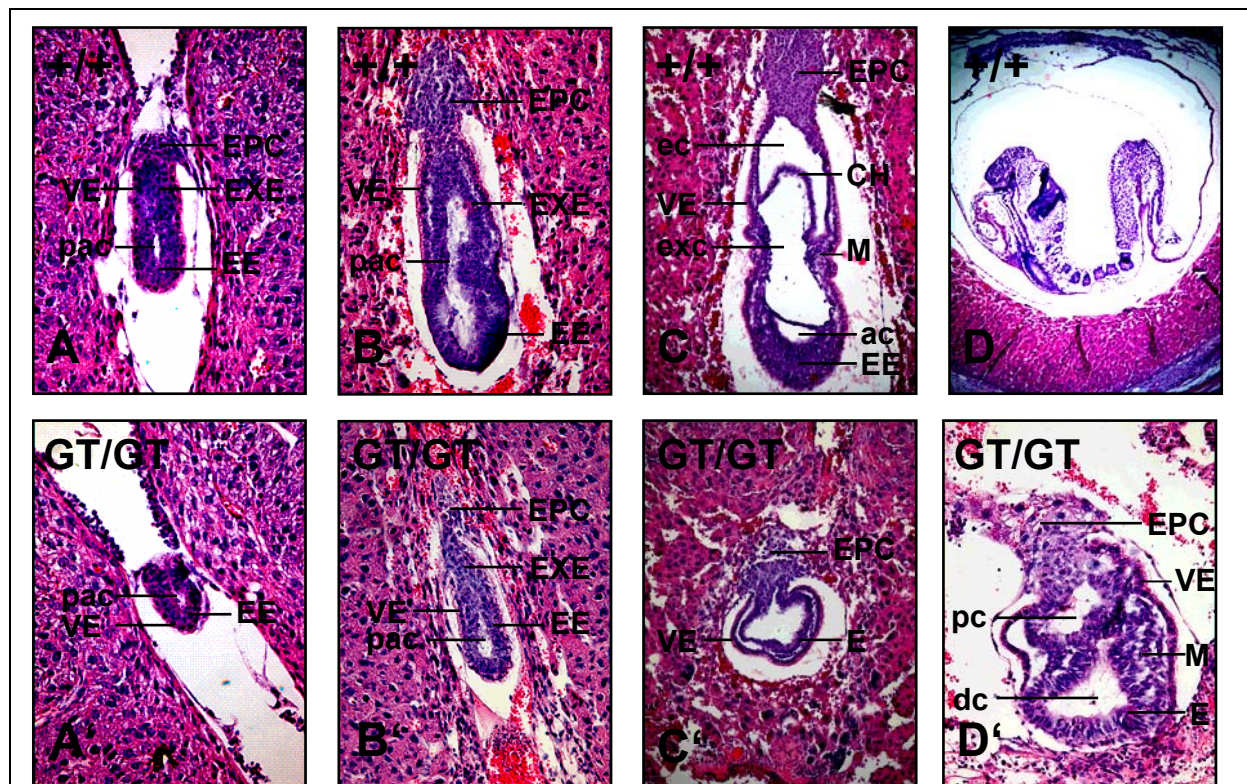


Abbildung 25: Anatomischer Vergleich von Wildtyp- und *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen im CD1-Hintergrund

Hämatoxylin/Eosin-Färbung von 10 µm dicken Paraffinschnitten; **A – D** Wildtypembryonen, **A' – D'** *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen; **A und A'** E5.5, **B und B'** E6.5, **C und C'** E7.5, **D und D'** E8.5

Abkürzungen: ac = amniotische Höhle, CH = Chorion, dc = distale Höhle, E = Ektoderm, ec = ekto-plazentale Höhle, EE = embryonales Ektoderm, EPC = ekto-plazentaler Kegel, exc = Exocoelom, EXE = extraembryonales Ektoderm, M = Mesoderm, pac = proamniotischer Kanal, pc = proximale Höhle, VE = viscerales Endoderm

Vergrößerungen: A, A', B, B', D' 200x; C, C' 100x, D 50x

Bemerkenswert ist die Hakenform, die für die Mehrzahl der *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen an E7.5 und E8.5 charakteristisch ist. Diese Hakenform wird deutlich, wenn man sagittale Serienschritte durch einen kompletten *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryo betrachtet (Abb. 26). Der Haken ist in einem 90°-Winkel in Bezug auf die Rechts-Links-Achse des Uterushorns, die normalerweise der anterior-posterioren Achse entspricht, angelegt.

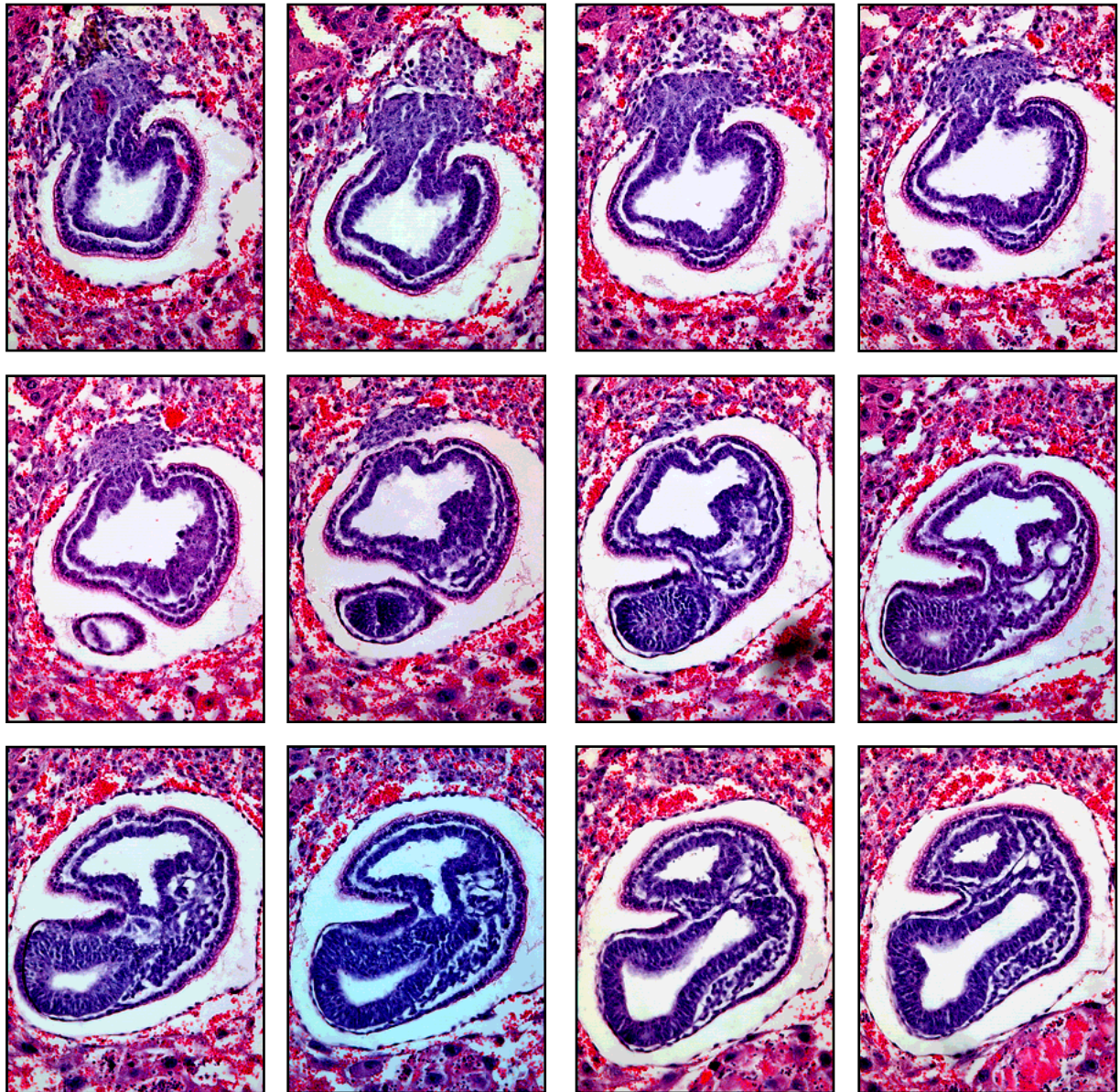


Abbildung 26: Struktur eines *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryos an E7.5

Serienschnitte des Embryos aus Abbildung 25 C'

Vergrößerungen jeweils 200x

Generell variiert die Größe der *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen gegen Ende ihrer Entwicklung an E8.5 und E9.5. Dieses ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in ihrer Entwicklung im proximalen Bereich, dort wo sich normalerweise die chorio-allantoische Plazenta bildet, den Kontakt zum maternalen Deciduum verlieren. Im Vergleich zur normalen Position innerhalb des Deciduums liegen die homozygot mutanten Embryonen dann an E8.5 viel tiefer in der deciduellen Krypte. Diese tiefe Position ohne Anschluß an maternales Gewebe sieht man bei einigen *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen schon an E6.5, wohingegen sich andere *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen an E7.5 noch an der normalen Position in der Mitte des Deciduums befinden und noch einen geringen Kontakt zum maternalen Gewebe haben. Die Deciduen entwickeln sich in jedem Fall normal, unabhängig davon, ob sie normale entwickelte oder *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen enthalten.

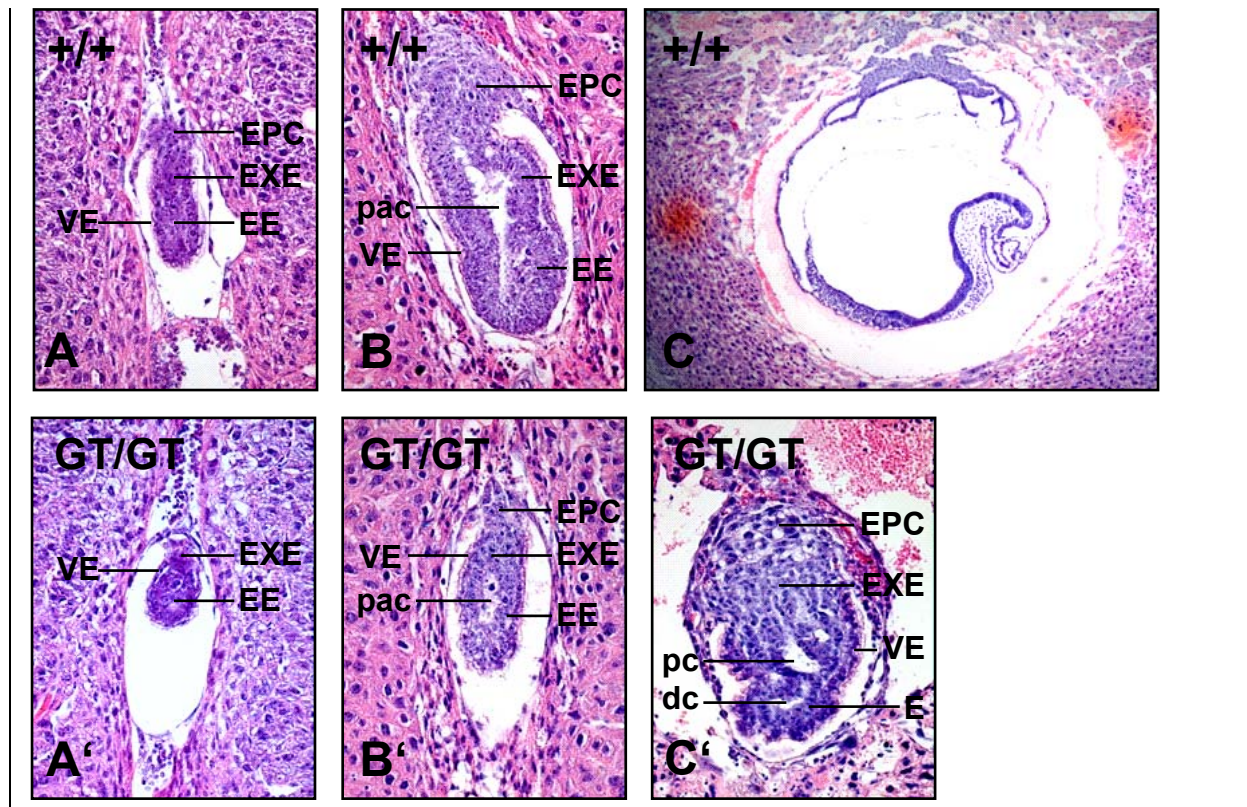
In der 129S2/SvHsd-Linie ist die Entwicklung der *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen während des gesamten Verlaufes, auch bezüglich der Größe und der Kavitation an E8.5, sehr ähnlich zu der in der CD1-Linie. Auch im genetischen C57BL/6J-Hintergrund ist der Phänotyp in den *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen ähnlich. An E5.5 sind die *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen noch nicht entlang der proximodistalen Achse elongiert (Abb. 27 A'). Wie im gemischten genetischen Hintergrund ist eine zylindrische Form des Embryos erst an E6.5 sichtbar (Abb. 27 B'). Jedoch tritt die Unterentwicklung in den homozygoten Mutanten im Stadium E8.5 noch deutlicher hervor als im gemischten genetischen CD1-Hintergrund und im 129S2/SvHsd-Hintergrund. Im C57BL/6J-Hintergrund sind die Embryonen noch kleiner, die embryonalen Höhlen sind nicht so deutlich ausgebildet wie bei homozygot mutanten Embryonen in den anderen Linien und eine Hakenform der Embryonen ist nicht erkennbar (Abb. 27 C').

Abbildung 27: Anatomischer Vergleich von Wildtyp- und *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen im C57BL/6J-Hintergrund

Hämatoxylin/Eosin-Färbung von 10 µm dicken Paraffinschnitten; **A – C** Wildtyp-Embryonen, **A' – C'** *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen; **A und A'** E5.5, **B und B'** E6.5, **C und C'** E8.5

Abkürzungen: dc = distale Höhle, E = Ektoderm, EE = embryonales Ektoderm, EPC = ekto-plazentaler Kegel, EXE = extraembryonales Ektoderm, pac = proamniotischer Kanal, pc = proximale Höhle, VE = viscerales Endoderm

Vergrößerungen: A, A', B, B', C' 200x; C 50x



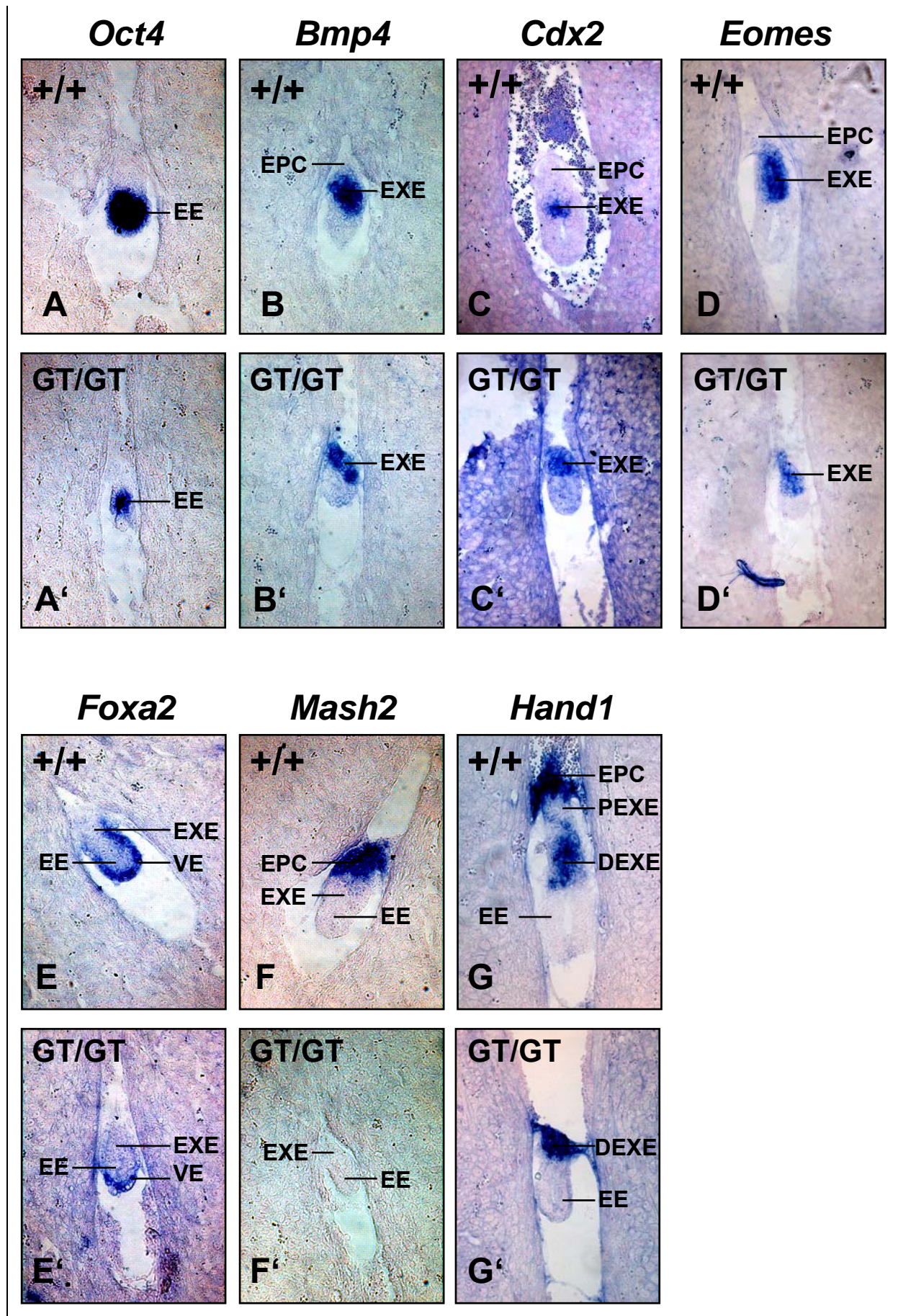
Um die Bildung bestimmter Gewebe während der frühen Postimplantationsentwicklung in *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Embryonen genauer zu analysieren, wurde die Expression einiger gewebspezifischer Gene in Embryonen des Stadiums E5.5 untersucht. *Oct4*-mRNA markiert das undifferenzierte embryonale Ektoderm (Epiblast) (Scholer *et al.*, 1990), *Foxa2*-mRNA das gesamte viscerele Endoderm (Perea-Gomez *et al.*, 1999), *Bmp4*-mRNA das gesamte extraembryonale Ektoderm (Winnier *et al.*, 1995; Waldrip *et al.*, 1998), *Cdx2*-mRNA die Trophoblaststammzellen im distalen Abschnitt des extraembryonalen Ektoderms, *Eomesodermin*-mRNA ebenfalls die Trophoblaststammzellen und zusätzlich auch den proximalen Bereich des extraembryonalen Ektoderms (Russ *et al.*, 2000) und *Mash2*-mRNA (Guillemot *et al.*, 1994; Guillemot *et al.*, 1995; Scott und Cross, 1996; Nakayama *et al.*, 1997; Rossant *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2000) sowie *Hand1*-mRNA (Cross *et al.*, 1995; Cserjesi *et al.*, 1995; Scott und Cross, 1996; Scott *et al.*, 2000) den ektoplazentalen Kegel.

Die Ergebnisse der *In situ*-Hybridisierungen mit RNA-Sonden für diese Gene auf Paraffinschnitten zeigen korrekte Expressionsdomänen für *Oct4* (Abb. 28 A, A'), *Bmp4* (Abb. 28 B, B'), *Cdx2* (Abb. 28 C, C') und *Eomesodermin* (Abb. 28 D, D') sowohl in Wildtyp- als auch in *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Embryonen des Stadiums E5.5.

Allerdings markieren die Domänen von *Bmp4*, *Cdx2* und *Eomesodermin* anders als in den Wildtypen den proximalsten Abschnitt der *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen, obwohl sie keine größere Ausdehnung, sondern einen normalen Umfang besitzen und im Vergleich zum Epiblast die richtige Lage haben. *Foxa2* ist in Wildtyp-Embryonen im gesamten visceralen Endoderm exprimiert, sowohl im embryonalen als auch im extraembryonalen Abschnitt (Abb. 28 E). In den *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen ist *Foxa2* jedoch nur im den das embryonale Ektoderm umgebenden Teil des visceralen Endoderms vorhanden (Abb. 28 E'). Die größte Besonderheit der *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen ist allerdings das Fehlen einer *Mash2*-Expressionsdomäne (Abb. 28 F'). In Wildtyp-Embryonen findet man *Mash2* im ekto-plazentalen Kegel am proximalen Pol (Abb. 28 F). *Hand 1* ist im Wildtyp-Embryo nicht nur im ekto-plazentalen Kegel, sondern auch im distalen Bereich des extraembryonalen Ektoderms detektiert (Abb. 28 G). Im Gegensatz dazu findet man in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen nur eine *Hand1*-Domäne, nämlich am proximalen Pol (Abb. 28 G'). Da diese Domäne an das embryonale Ektoderm grenzt, dürfte sie der Expression im distalen extraembryonalen Ektoderm in normal entwickelten Embryonen entsprechen.

Das Fehlen der *Mash2*-Expression und der proximalen *Hand1*-Expression sowie die sich direkt am proximalen Ende befindenden Domänen von *Bmp4*, *Cdx2* und *Eomesodermin* bestätigen die schon im vorhergegangenen Kapitel beschriebene Absenz eines ekto-plazentalen Kegels in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen an E5.5.

Abbildung 28: Expression von Markergenen in Wildtyp- und *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen an E5.5
In situ-Hybridisierung auf 7 µm dicken Paraffinschnitten; **A – G** Wildtyp-Embryonen, **A' – G'** *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen; **A und A'** *Oct4*, **B und B'** *Bmp4*, **C und C'** *Cdx2*, **D und D'** *Eomesodermin* (*Eomes*), **E und E'** *Foxa2*, **F und F'** *Mash2*, **G und G'** *Hand1*
 Abkürzungen: DEXE = distales extraembryonales Ektoderm, EE = embryonales Ektoderm, EPC = ekto-plazentaler Kegel, EXE = extraembryonales Ektoderm, PEXE = proximales embryonales Ektoderm, VE = viscerales Endoderm
 Vergrößerungen jeweils 200x



Im weiteren Verlauf der Entwicklung der *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen findet man an E6.5 eine sehr kleine *Mash2*-Expressionsdomäne im proximalen Bereich (Abb. 29 B). Selbst bis zu E8.5 hat sich die *Mash2*-Domäne nur geringfügig erweitert (Abb. 29 C). Dieses geht einher mit der im vorangegangenen Kapitel aufgrund der Zellmorphologie gemachten Beurteilung, daß an E8.5 nur eine geringe Population an Trophoblast-Zellen vorhanden ist.

Um die weitere Entwicklung von embryonalem und extreembryonalem Ektoderm zu untersuchen, wurde die Expression von *Oct4* und *Bmp4* zwischen E6.5 und E8.5 analysiert. In Wildtyp-Embryonen wird *Oct4* an E6.5 im gesamten embryonalen Ektoderm exprimiert (Abb. 29 D), ab E7.5 verschwindet diese Expression und an E8.5 findet man *Oct4*-mRNA nur noch in den primordialen Keimzellen. Der Umfang der *Bmp4*-Expression ist in Wildtyp-Embryonen schon an E6.5 auf einen schmalen Ring im distalen extraembryonalen Ektoderm reduziert (Abb. 29 H). An E8.5 wird *Bmp4*-mRNA nur in mesodermalen Geweben gebildet.

In *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen zeigen *Oct4* und *Bmp4* während dieser Periode Expressionsmuster, die sehr denen in normal entwickelten Embryonen an E5.5 und E6.5 ähneln. An E6.5 sind beide Muster (Abb. 29 E, F, I) ähnlich dem in Wildtyp-Embryonen des Stadiums E5.5 (Abb. 28 A, B). Allerdings ist *Oct4* in den homozygoten Mutanten im Bereich der proamniotischen Höhle nur schwach (Abb. 29 E), in peripheren Bereichen des embryonalen Ektoderms aber deutlich stärker exprimiert (Abb. 29 F). An E8.5 findet man eine *Oct4*-Expression im distalen Bereich der *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen als Halbring um die distale Höhle, der in Form und Gewebedurchmesser der Expressionsdomäne in Wildtypen an E6.5 ähnelt (Abb. 29 G). Die *Bmp4*-Domäne an E6.5 bildet nicht mehr den proximalen Pol des *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryo, sondern liegt in der Mitte der proximodistalen Körperachse (Abb. 29 I). Im *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryo des Stadiums E8.5 ist die *Bmp4*-Expression ausgedehnt und bildet ebenfalls eine Domäne in Form eines Halbringes, allerdings vorwiegend um eine proximale Körperhöhle herum (Abb. 29 J). Diese *Bmp4*-Expressionsdomäne ist bezüglich Form und Gewebedurchmesser vergleichbar mit der *Bmp4*-Expressionsdomäne in Wildtypen an E6.5.

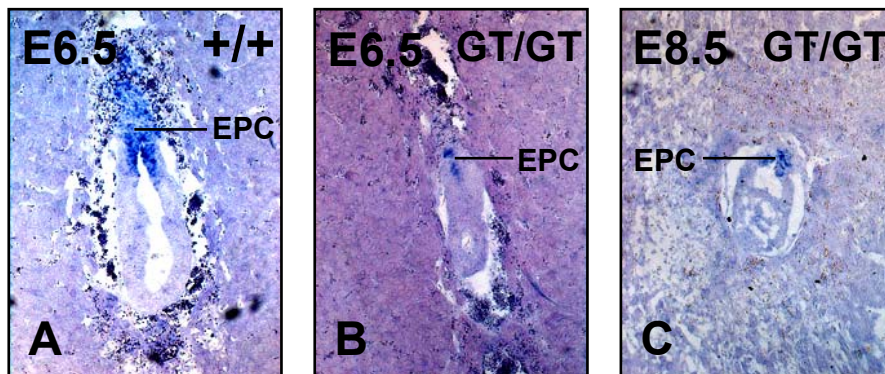
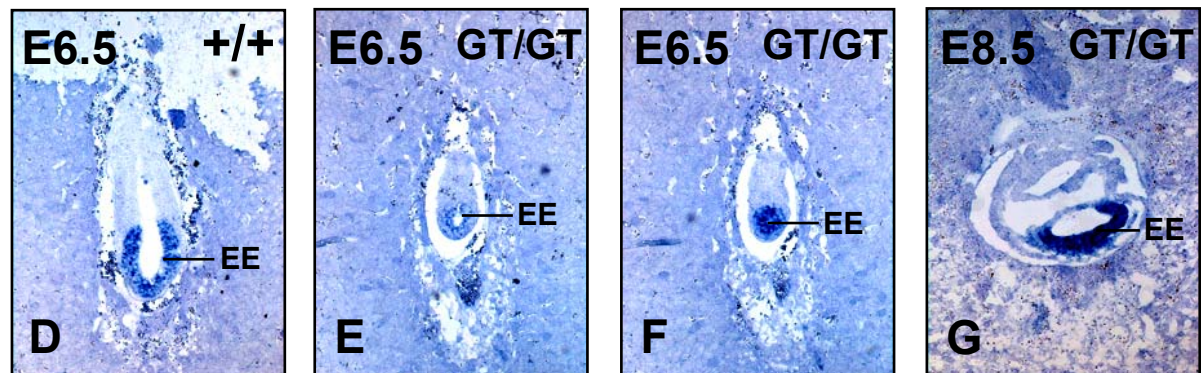
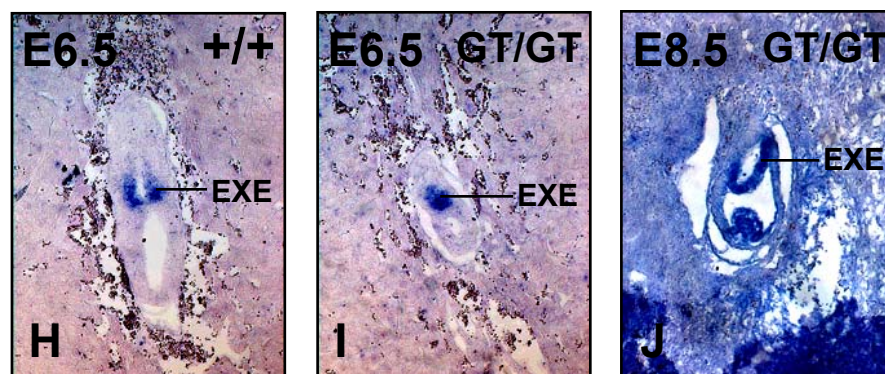
Mash2**Oct4****BMP4**

Abbildung 29: Expression von proximodistalen Markergenen in Wildtyp- und *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Embryonen zwischen E6.5 und E8.5

In situ-Hybridisierung auf 7 µm dicken Paraffinschnitten; **A - C** *Mash2*-Expression in einem Wildtyp-Embryo an E6.5 (**A**), in einem *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Embryo an E6.5 (**B**) und in einem *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Embryo an E8.5 (**C**); **D - G** *Oct4*-Expression in einem Wildtyp-Embryo an E6.5 (**D**), in einem *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Embryo an E6.5 (**E**, medialer Schnitt; **F**, lateraler Schnitt) und in einem *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Embryo an E8.5 (**G**); **H - J** *Bmp4*-Expression in einem Wildtyp-Embryo an E6.5 (**H**), in einem *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Embryo an E6.5 (**I**) und in einem *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Embryo an E8.5 (**J**)

Abkürzungen: EE = embryonales Ektoderm, EPC = ektoplazentaler Kegel, EXE = extraembryonales Ektoderm, VE = viscerales Endoderm

Vergrößerungen jeweils 200x

Demnach bleiben anscheinend embryonales und extraembryonales Ektoderm in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen bis einschließlich Stadium E8.5 in einem relativ undifferenzierten Zustand vergleichbar mit dem in normal entwickelten Embryonen an E6.5. Anhand der halbringförmigen Expressionsdomänen von *Oct4* und *Bmp4* kann man die distale Körperhöhle der homozygoten Mutanten als amniotische und die mittlere Körperhöhle als exocoelomische Höhle ansehen.

Insgesamt kann man sagen, daß der Entwicklungsdefekt in den *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen anfänglich durch das Fehlen eines ekto-plazentalen Kegels an E5.5 und im weiteren Verlauf durch eine Verzögerung der Entwicklung nicht nur im ekto-plazentalen Kegel, sondern auch im embryonalen und extraembryonalen Ektoderm gekennzeichnet ist. Anfänglich an E5.5 und E6.5 entspricht die Verzögerung ungefähr einem Tag, an E8.5 sind es schon zwei Tage bezogen auf den normalen Verlauf der Embryogenese.

Um festzustellen, ob *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen eine anterior-posteriore Achse bilden und die Differenzierung im Epiblast organisieren können, wurde die Expression von Genen untersucht, die für frühe anteriore und posteriore Strukturen charakteristisch sind. Die Expression von *Cer1* markiert das anteriore viscerele Endoderm (Belo *et al.*, 1997; Biben *et al.*, 1998), eine Zellpopulation die unmittelbar nach der Implantation an der distalen Spitze des Embryos entsteht, dann zur anterioren Seite wandert und Organisatorfunktionen bei der anterioren Musterbildung des Epiblasts, besonders bei der Bildung des Vorder- und Mittelhirns, ausübt. Im Gegensatz dazu detektiert *Brachyury* (*T*)-mRNA den Primitivstreifen (Wilkinson *et al.*, 1990), eine posteriore Struktur, die induzierende Wirkung bei der posterioren Musterbildung und der Formierung des Mesoderms hat.

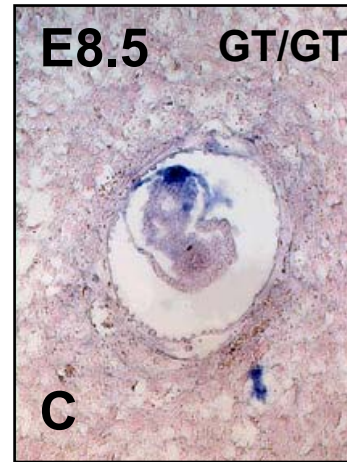
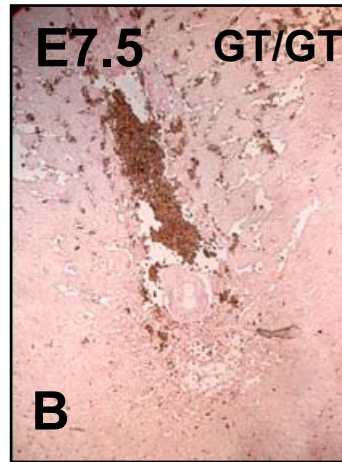
An E6.5 und E7.5 ist in Wildtyp-Embryonen *Cer1* im anterioren visceralen Endoderm (Abb. 30 A) und *Brachyury* im Primitivstreifen im posterioren Bereich des Epiblasts exprimiert (Abb. 30 D, F). In *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen wird an E6.5 jedoch weder *Cer1* noch *Brachyury* detektiert (Abb. 30 E). Auch an E7.5 tritt noch keine *Cer1*-Expression in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen auf (Abb. 34 B). *Brachyury* hingegen wird zu diesem Zeitpunkt ektopisch exprimiert (Abb. 30 G). An E8.5 ist dann auch eine *Cer1*-Expression zu sehen. *Cer1* und *Brachyury* bilden in diesem Stadium in

Bptf/Fac1^{GT/GT}-Embryonen distinkte Expressionsdomänen, die einander gegenüber liegen (Abb. 30 C, H). Allerdings entspricht die durch die beiden Domänen festgelegte Achse nicht der Links-Rechts-Achse des Uterus, die normalerweise mit der anterior-posterioren Achse des Embryos übereinstimmt. Aber dieses dürfte wahrscheinlich mit dem Verlust des Kontaktes zum Deciduum und dem Absinken in der Krypte zusammenhängen, weshalb sich homozygot mutante Embryones drehen könnten. Trotzdem kann man behaupten, daß in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen neben einer proximodistalen auch eine anterior-posteriore Achse angelegt wird, da für anteriore und posteriore Strukturen spezifische Transkripte an gegenüberliegenden Positionen gebildet werden.

Bptf/Fac1^{GT/GT}-Embryonen sind also in der Lage mit dem anterioren visceralen Endoderm und dem Primitivstreifen die Organisatoren zu formieren, die für die anterior-posteriore Musterbildung im visceralen Endoderm und im embryonalen Ektoderm notwendig sind. Darüber hinaus wäre es interessant zu wissen, ob auch der Knoten gebildet wird. Der Knoten ist eine Struktur, die gegen Ende der Gastrulation an der distalen Spitze des Embryos, am anterioren Ende des Primitivstreifens, entsteht. Der Knoten ist ein Organisator, der die Bildung von Mittellinienstrukturen wie Notochord, Neuralrohr und Darmrohr induziert. In Wildtyp-Embryonen sind an E7.0 bis E7.5 *Chordin* im Knoten (Pappano *et al.*, 1998) und *Nodal* unmittelbar um den Knoten herum exprimiert (Zhou *et al.*, 1993; Brennan *et al.*, 2001). Da der Primitivstreifen in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen nicht vor E8.5 etabliert ist, wurde untersucht, ob *Chordin*- und *Nodal*-Transkripte in homozygoten Mutanten an E9.5 vorhanden sind.

Die Resultate der durchgeführten Whole mount-*In situ*-Hybridisierungen für beide molekularen Marker zeigen an E9.5 distinkte Expressionsmuster am voraussichtlich distalen Pol der *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen (Abb. 31 B, D), die den Mustern in Wildtyp-Embryonen des Stadiums E7.5 (Abb. 31 A, C) sehr ähnlich sind.

Cer1



T

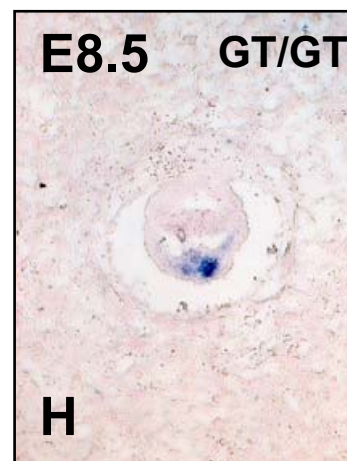
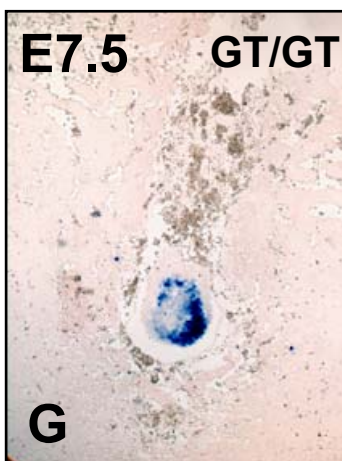
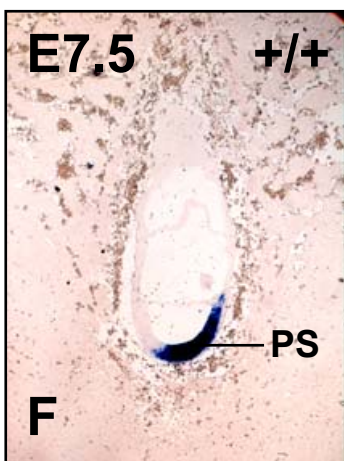
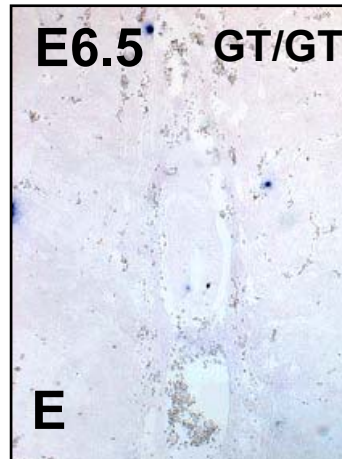
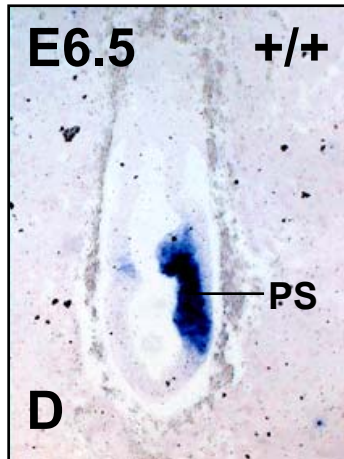


Abbildung 30: Expression von anterior-posterioren Markergenen in Wildtyp- und *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen zwischen E6.5 und E8.5

In situ-Hybridisierung auf 7 µm dicken Paraffinschnitten; **A – C** *Cer1*-Expression in einem Wildtyp-Embryo an E7.5 (**A**), in einem *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryo an E7.5 (**B**) und in einem *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryo an E8.5 (**C**); **D – H** *Brachyury (T)*-Expression in einem Wildtyp-Embryo an E6.5 (**D**), in einem *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryo an E6.5 (**E**) in einem Wildtyp-Embryo an E7.5 (**F**), in einem *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryo an E7.5 (**G**) und in einem *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryo an E8.5 (**H**)

Abkürzungen: AVE = anteriores viscerales Endoderm, PS = Primitivstreifen

Vergrößerungen jeweils 200x

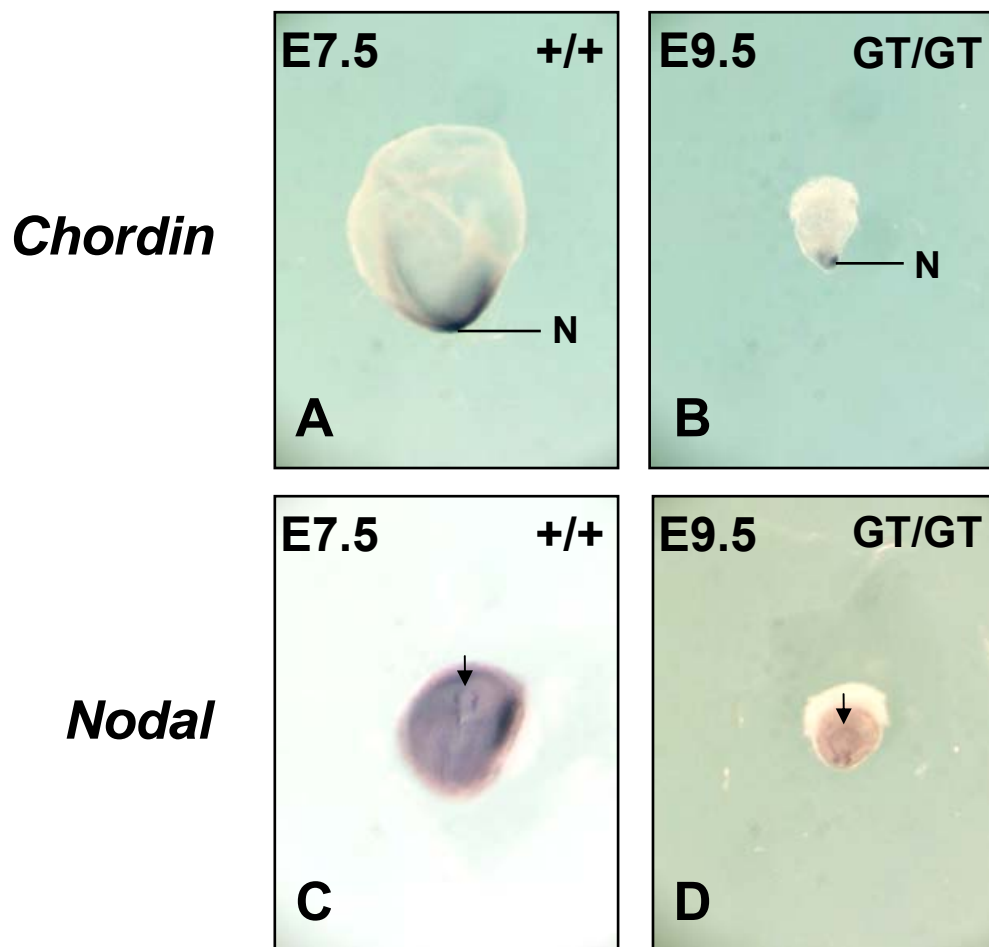


Abbildung 31: Expression von Knoten-spezifischen Genen in Wildtyp- und *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen

In situ-Hybridisierung von Whole mount-Embryonen; **A und B** *Chordin*-Expression in einem Wildtyp-Embryo an E7.5 (**A**) und in einem *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryo an E9.5 (**B**); **C und D** durch Pfeile markierte *Nodal*-Expression in ventralen Ansichten eines Wildtyp-Embryos an E7.5 (**C**) und eines *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryos an E9.5 (**D**)

Abkürzung: N = Knoten

Vergrößerungen jeweils 100x

Diese Ergebnisse zeigen, daß in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen nach der Bildung einer proximodistalen und einer anterior-posterioren Körperachse sowie der Formierung von Organisatorgeweben für die anterior-posteriore Musterbildung mit dem Knoten ein weiterer Organisator gebildet wird, der für die Induktion von Mittellinienstrukturen und die Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie verantwortlich ist, und die Gastrulation prinzipiell vollendet wird. Wegen ihrer Letalität kann aber in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen die Fähigkeit zur Ausbildung einer Links-Rechts-Asymmetrie nicht überprüft werden.

6 Diskussion

6.1 Die Struktur des *Bptf/Fac1*-Gens deutet auf eine genregulatorische Funktion hin

Das murine *Bptf/Fac1*-Gen besteht aus 31 Exons und umfaßt einen genomischen Locus von ungefähr 100 kb auf Chromosom 11. Durch den Gebrauch zweier verschiedener Polyadenylierungsstellen generiert das Gen auf der mRNA-Ebene zwei Isoformen, die lange Isoform *Bptf* mit 9420 bp und die kurze Isoform *Fac1* mit 2655 bp. *Fac1* repräsentiert dabei die 5'-Sequenz von *Bptf*. Da sie mehrere DNA-Bindungsmotive (saure und basische Domäne, DDT-Domäne, PHD/LAP-Zinkfinger motive) sowie ein NLS und ein NES besitzen, sind beide Isoformen in der Lage, in den Zellkern zu gelangen und an DNA zu binden. Beide Isoformen dürften dieselben DNA-Bindungssequenzen erkennen.

In früheren Studien wurde bereits gezeigt, daß humanes FAC1 *in vitro* eine spezifische DNA-Sequenz, das FAC1-Bindungselement (FBE) erkennt und die Transkription bestimmter Gene reprimieren kann, die unter der Kontrolle eines FBE-enthaltenden Promotors stehen (Jordan-Sciutto *et al.*, 1999 I).

Im Gegensatz zu FAC1 enthält BPTF neben zwei zusätzlichen am C-Terminus gelegenen PHD/LAP-Zinkfinger motiven auch eine Bromodomäne. Die Bromodomäne ist an der Remodellierung von Nukleosomen und deshalb auch an der Modifizierung der Chromatinstruktur beteiligt. Dabei acetyliert die Bromodomäne Lysin-Reste von Histonen, besonders von Histon H4 (Haynes *et al.*, 1992; Zeng und Zhou, 2002). Da eine Bromodomäne nur in BPTF vorhanden ist, läßt sich vermuten, daß es zwischen beiden Isoformen Unterschiede in der biologischen Funktion gibt. Als Komponente des NURF-Komplexes (Barak *et al.*, 2003) dürfte BPTF beim ersten Schritt der Nukleosomen-Remodellierung für die Erkennung spezifischer DNA-Regionen und für die Acetylierung der Histonproteine der Nukleosomen zuständig sein. Nach der Auflockerung der Chromatinstruktur durch den NURF-Komplex sind die in diesen chromosomalen Regionen liegenden Gene für spezifische Transkriptionsfaktoren zugänglich. Hier könnte BPTF als zusätzliche Funktion an der Aktivierung oder

Reprimierung der Transkription von Genen beteiligt sein, die unter der Kontrolle eines FBE-enthaltenden Promotors stehen. Die Sequenzspezifität von BPTF könnte also bei zwei verschiedenen Schritten der Genregulation von Bedeutung sein.

Da FAC1 an dieselben DNA-Sequenzen binden dürfte wie BPTF, könnte es bei der Regulierung derselben Gene involviert sein. Allerdings kann FAC1 nicht aktiv bei der Nukleosomen-Remodellierung beteiligt sein, da es keine Bromodomäne beinhaltet. Erst wenn die Chromatinstruktur bereits aufgelockert ist, könnte FAC1 direkt an die DNA binden. Trotzdem könnte FAC1 auch schon zu einem früheren Zeitpunkt in die Genregulation eingreifen, nämlich indem es mit BPTF um die Inkorporation in den NURF-Komplex kompetitiert. Dadurch könnte verhindert werden, daß sich der NURF-Komplex an der Nukleosomen-Remodellierung beteiligt. Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob FAC1 überhaupt in den NURF-Komplex eingebaut werden kann. Hierzu wären Bindungsmotive im FAC1-Protein für mindestens eine der anderen Komponenten (SNF2L, RbAP(p46) oder RbAP(p48)) des Komplexes nötig. Im murinen Bptf-Protein könnten diese Erkennungsstellen im C-terminalen Bereich liegen, der von den Exons 10 bis 31 kodiert wird. So könnte FAC1 ebenfalls zu zwei Zeitpunkten in die Genregulation eingreifen. Zuerst beim Zusammenbau des NURF-Komplexes würde FAC1 der Funktion von BPTF durch Konkurrenz entgegenwirken. Später bei der direkten DNA-Bindung könnten beide Isoformen denselben Effekt, entweder die Aktivierung oder die Unterdrückung der Transkription, bewirken. Allerdings könnten die beiden Isoformen bei diesem Schritt auch gegensätzliche Effekte haben, nämlich wenn die C-terminale BPTF-Sequenz zusätzliche Motive enthält, die für die Bindung an Promotoren, Enhancer- oder Silencer-Elemente oder andere Transkriptionsfaktoren wichtig sind. Deshalb ist es interessant zu sehen, ob die beiden Isoformen coexprimiert werden und in Konkurrenz zueinander stehen, um den Einbau in den NURF-Komplex und/oder die Bindung an FBE-Elemente.

Zusätzlich zur Bildung von zwei Isoformen wird in der Maus die Varianz von Transkripten des *Bptf/Fac1*-Gens durch mehrere alternative Spleißvorgänge erhöht, bei denen allerdings keine Verschiebungen des offenen Leserahmens erfolgen. Allerdings führt ein Spleißvorgang, bei dem Exon 27 übersprungen wird, zum Verlust eines kompletten PHD-Zinkfingermotivs am C-Terminus. Dieses deutet auf eine funktionelle Redundanz der beiden C-terminalen Zinkfinger motive hin.

6.2 Die funktionellen Domänen von Bptf/Fac1 sind über Artengrenzen hinweg hoch konserviert

Die gesamte Aminosäuresequenz des Bptf/Fac1-Proteins von *Mus musculus* zeigt eine Ähnlichkeit von 68.1% bzw. 64.6% zu den orthologen Sequenzen von *Rattus norvegicus* und *Homo sapiens sapiens*. Jedoch sind in Maus, Ratte und Mensch alle bekannten funktionellen Domänen des BPTF/FAC1-Proteins hochkonserviert, da alle DNA-Bindungsdomänen sowie NLS und NES in den drei Spezies zu mindestens 93,3% und teilweise sogar zu 100% identisch sind.

Dieses dürfte zumindest teilweise, vor allem bei der Bromodomäne, in der Funktion von BPTF bei der Acetylierung von Lysin-Resten von Histon H4 begründet sein. Histon H4 ist aufgrund seiner fundamentalen Funktion in der eukaryotischen Zelle bezüglich seiner Aminosäuresequenz eines der am stärksten konservierten Proteine während der Evolution der Arten. Da sich die dreidimensionale Struktur von Histon H4 während der Evolution kaum verändert hat, sind auch die Strukturen der direkten Interaktionspartner hochkonserviert geblieben. Und da BPTF wegen seiner Bromodomäne anscheinend für die Acetylierung der hochkonservierten Lysin-Reste von Histon H4 verantwortlich ist, mußte im Laufe der Evolution auch die Struktur von BPTF zumindest in den funktionellen Bereichen konstant bleiben.

Trotzdem gibt es zwei erwähnenswerte Unterschiede zwischen den Bptf/Fac1-Sequenzen von Maus, Ratte und Mensch. Erstens hat die prognostizierte Aminosäuresequenz der Ratte im Gegensatz zu den Orthologen von Maus und Mensch eine N-terminale Verlängerung von 380 bis 450 Aminosäuren. In der Maus wurde eine orthologe Sequenz auf cDNA-Ebene gefunden. Diese wird von 11 Exons kodiert, die direkt in 5'-Richtung vor dem *Bptf/Fac1*-Gen liegen. Bisher gibt es aber keinen Hinweis, daß ein murines *Bptf/Fac1*-Transkript existiert, welches diese 5'-Sequenz enthält. Eventuell gab es ein ursprüngliches *Bptf/Fac1*-Gen, welches diese 5'-Sequenz beinhaltete und das während der Evolution durch eine Mutation unterbrochen wurde, so daß zwei neue Gene entstanden. Und da anscheinend das 5'-Genfragment keine Bereiche enthält, die für irgendwelche wichtigen Proteindomänen kodieren, war dessen Verlust für die Funktion des vom 3'-Genfragment kodierten Bptf/Fac1-Restproteins unbedeutend. Allerdings ist

wahrscheinlicher, daß diese 5'-Sequenz gar nicht zur Ratten-cDNA gehört, denn bisher wurde diese anhand eines Computerprogrammes vorhergesagte cDNA-Sequenz experimentell nicht verifiziert. Zweitens gibt es im Bptf/Fac1-Protein von Maus und Ratte zwei C-terminale PHD/LAP-Zinkfinger motive, im menschlichen Protein aber nur eines. In der Maus wurde ein Spleißvorgang an Exon 27 identifiziert, der ebenfalls zur Deletion eines vollständigen PHD/LAP-Zinkfinger motives führt. In humanen EST-Datenbanken wurden hierfür keine entsprechenden Spleißvarianten gefunden. Dieses beweist eine funktionelle Redundanz der beiden C-terminalen Zinkfinger motive, da anscheinend eines für die funktionell notwendige DNA-Bindung ausreicht. Wahrscheinlich ist im Verlauf der Evolution des Menschen ein C-terminales PHD/LAP-Zinkfinger motiv deletiert.

6.3 *Bptf/Fac1* wird während der Postimplantationsentwicklung und während der postnatalen Hirnentwicklung exprimiert

Eine Northern-Blot-Analyse zeigt eine Co-Expression von *Bptf* und *Fac1* in adulten Organen. Die Ergebnisse der *In situ*-Hybridisierungen in den Stadien E5.5 bis E12.5 mit zwei verschiedenen *Bptf/Fac1*-Sonden geben keinen vollständigen Aufschluß über eine Co-Expression der beiden Isoformen. Man kann lediglich sagen, daß an E5.5 nur *Fac1* exprimiert wird, nämlich im ekto-plazentalen Kegel und im Epiblast um die sich formierende proamniotische Höhle herum. Da keine Sonde hergestellt werden kann, die nur *Fac1*-Transkripte detektiert, läßt sich nicht ermitteln, in welchen Geweben nur *Bptf* exprimiert wird.

Während der Gastrulation ist *Bptf/Fac1* im ekto-plazentalen Kegel und im Chorion sowie im kompletten Epiblast exprimiert. Die *In situ*-Hybridisierungen genauso wie die LacZ-Färbungen für das Bptf/Fac1- β -Galactosidase-Fusionsprotein in heterozygoten Embryonen zeigen eine sich fortlaufend ausbreitende Expression während der gesamten pränatalen Neuronalentwicklung, beginnend im Neuroepithel an E8.5, dann in tiefer liegenden Schichten des Gehirns und des Neuralrohrs und schließlich ab E16.5 im gesamten Gehirn und Rückenmark sowie in angrenzenden neuronalen Strukturen wie Retina und Spinalganglien. Bis zum Ende der pränatalen Entwicklung stellt man darüber hinaus eine starke Expression in fast allen anderen

Organen und Geweben fest. Am Ende der Embryonalentwicklung ist *Bptf/Fac1* in Geweben ektodermalen (Gehirn, Rückenmark, orale und olfaktorische Epithelien, Haarfollikel), mesodermalen (Herz, Niere, Muskeln, Knorpel) und endodermalen Ursprungs (Lunge, Leber, Thymus) exprimiert.

Im Gegensatz dazu ist nach der Geburt eine zunehmende Herunterregulierung der Expression in nahezu allen Organen und Geweben festzustellen. Die Hybridisierung von Northern Blots von RNA-Pools adulter Organe erbringt nur sehr schwache Signale und die LacZ-Färbungen zeigen in den meisten Organen gar keine oder nur eine sehr schwache Expression. Ausnahmen sind drei Zellschichten im Gehirn, die pyramidale Schicht des Hippocampus, die granuläre Schicht des Gyrus dentatus und die granuläre Zellschicht im Cerebellum, welche die einzigen erwähnenswerten Expressionsdomänen in der adulten Maus sind. Diese beiden Domänen wurden auch bereits in einer früheren Arbeit beschrieben (Barak *et al.*, 2003).

Insgesamt betrachtet breitet sich die *Bptf/Fac1*-Expression während der Embryonalentwicklung immer weiter aus, bis an E18.5 die maximale Ausdehnung erreicht ist. Während der postnatalen Entwicklung jedoch wird die Expression in fast allen Geweben herunterreguliert und ist im adulten Stadium kaum noch nachweisbar. Dieses weist darauf hin, daß *Bptf/Fac1* für Differenzierungsprozesse während der Organogenese von Bedeutung ist. Besonders interessant erscheint hierbei die Neuronalentwicklung, da hier eine Expression bereits im frühesten neuronalen Gewebe, dem Neuroepithel der Gehirnblasen und des Neuralrohrs, zu sehen ist und sie sich mit der Entwicklung des zentralen Nervensystems schrittweise in angrenzende, neu gebildete Zellschichten ausbreitet. Dieses bestätigt eine Funktion von *Bptf/Fac1* während der Neuronalentwicklung, wie sie bereits in früheren Arbeiten angedeutet wurde (Bowser *et al.*, 1995).

6.4 Die Gene Trap-Mutation und die Mauslinie A012C04 ermöglichen eine Analyse der Funktion des *Bptf/Fac1*-Genproduktes

Es wurde der genaue Integrationsort des Gene Trap-Vektors pPT1 β geo in Intron1 des *Bptf/Fac1*-Gens ermittelt. Die Existenz des Fusionstranskriptes wurde ebenso

nachgewiesen wie das Fehlen von Transkripten, die von Exons gebildet werden, die in 3'-Richtung von Intron 1 liegen.

Die Gene Trap-Mutation führt zu einem vollständigen Funktionsverlust beider Isoformen, da im Bptf/Fac1- β -Galactosidase-Fusionsprotein nur die von Exon 1 kodierte saure Domäne vorhanden ist. Durch das Fehlen der DDT-Domäne, der PHD/LAP-Zinkfinger motive, der Bromodomäne sowie des nukleären Import- und Exportsignals kann das Fusionsprotein nicht an DNA und Histone binden und nicht einmal in den Zellkern gelangen. Höchstwahrscheinlich ist auch der Einbau in den NURF-Komplex nicht möglich. Die hierfür nötigen Bindungsdomänen für die anderen Bestandteile des Komplexes sind noch nicht bekannt, aber es ist unwahrscheinlich, daß sie im von Exon 1 kodierten Bereich des Proteins liegen, da erstens dieser mit 67 Aminosäuren sehr kurz ist und zweitens Positionen im nur in der Bptf-Isoform enthaltenen elongierten C-Terminus wahrscheinlicher sind.

Somit ist anhand von *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Embryonen der Mauslinie A012C04 eine Analyse der Funktion von Bptf/Fac1 möglich, indem man untersucht, welche Auswirkungen das Fehlen des Genproduktes hat. Allerdings kann nicht vollständig zwischen den Funktionen der beiden Isoformen Fac1 und Bptf differenziert werden, da nicht bekannt ist, in welchen Geweben nur Bptf gebildet wird. Um die Funktion von Bptf unabhängig von der Funktion von Fac1 untersuchen zu können, wäre ein Knock-out-Ansatz sinnvoll, bei dem die Bromodomäne und/oder die beiden C-terminalen PHD/LAP-Zinkfinger motive deletiert werden. Die Funktion von Fac1 wäre dabei nicht beeinflusst. Dahingegen ist eine Untersuchung nur der Funktion von Fac1 nicht möglich.

6.5 Die Gene Trap-Mutation macht eine wichtige Funktion von Bptf/Fac1 in der frühen Postimplantationsentwicklung deutlich

Bptf/Fac1^{GT/GT}-Embryonen zeigen eine normale Präimplantationsentwicklung, aber unmittelbar nach der Implantation unterbleibt die proximodistale Verlängerung des Embryos, die normalerweise den Eizylinder-Embryo hervorbringt. Zwar ist der

Umfang des Epiblasts auch etwas reduziert, der Grund für die fehlende Elongation des Embryos ist aber vor allem die verzögerte Ausbildung sowie der reduzierte Umfang des ekto-plazentalen Kegels. Dieses führt zu einer unzureichenden Verbindung des Embryos mit dem maternalen Deciduum und Blutkreislauf. Während sich das Deciduum normal, gemäß dem Verlauf der Schwangerschaft entwickelt, ist der *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryo in seiner Entwicklung bis zum Ende der Gastrulation um zwei Tage retardiert. Dabei verliert er früher oder später vollends den Kontakt zum Deciduum. Abhängig vom Zeitpunkt des Kontaktverlustes sind das Wachstum und die Kavitation des Embryos unterschiedlich stark beeinträchtigt. Wahrscheinlich aufgrund mangelnder Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff infolge einer fehlenden Verbindung zum maternalen Blutkreislauf sterben *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen zwischen E8.5 und E9.5 ab.

Trotz des frühen Defekts in der Bildung extraembryonalen Gewebes, schreiten die Differenzierungsprozesse im Epiblast bzw. embryonalen Ektoderm voran, auch wenn hier ebenfalls deutliche Verzögerungen wahrzunehmen sind. So erfolgen Kavitationsvorgänge und es wird Mesoderm gebildet. Wie die Expression spezifischer Markergene zeigt, ist der fehlgebildete *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryo des weiteren in der Lage eine proximodistale und - mit bis zu zwei Tagen Verzögerung - eine anterior-posteriore Achse auszubilden sowie Organisator-Strukturen wie das anteriore viscerale Endoderm, den Primitivstreifen und den Knoten anzulegen. Wenn der Knoten morphologisch korrekt gebildet ist, wäre der *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryo möglicherweise bei einer längeren Lebensdauer auch fähig, Mittellinienstrukturen (Notochord, Neuralrohr und Darmrohr) zu formieren und eine Links-Rechts-Asymmetrie zu etablieren.

6.6 *Bptf/Fac1* ist notwendig für die Bildung des ekto-plazentalen Kegels an E5.5

An E5.5 ist in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen die Abwesenheit eines ekto-plazentalen Kegels durch die fehlenden Expressionen der bHLH-Transkriptionsfaktoren *Mash2* und *Hand1* angezeigt. Beides sind essentielle Faktoren für die Kontrolle der Differenzierung der Trophoblast-Zellen (Scott *et al.*, 2000).

Vor der Implantation des Embryos in den Uterus ist *Mash2* im Trophektoderm exprimiert, nach der Implantation in den diploiden Trophoblasten, aber nicht in den sekundären Riesenzellen (Guillemot *et al.*, 1994; Nakayama *et al.*, 1997). Eine Funktionsverlust-Mutation des *Mash2*-Gens verursacht einen letalen Phänotyp um E10.0 aufgrund eines plazentalen Defektes, bei dem kein Spongiotrophoblast und nur ein unterentwickeltes Chorion, aber ein Überschuß an sekundären Riesenzellen gebildet werden. Die frühe Postimplantationsentwicklung verläuft jedoch normal (Guillemot *et al.*, 1994; Tanaka *et al.* 1997). Bei einer Funktionsverlust-Mutation des *Hand1*-Gens stirbt der Embryo bereits um E8.0, da die Bildung von sekundären Riesenzellen verhindert wird (Firulli *et al.*, 1998; Riley *et al.*, 1998). Demnach haben *Mash2* und *Hand1* antagonistische Funktionen. *Hand1* fördert die Bildung von sekundären Riesenzellen, *Mash2* inhibiert die Bildung von sekundären Riesenzellen und ist nötig für die Bildung und Aufrechterhaltung der Spongiotrophoblast-Zellpopulation (Scott *et al.*, 2000).

Der Phänotyp der Gene Trap-Mutation des *Bptf/Fac1*-Gens ist gegensätzlich zum Phänotyp der *Mash2*-Mutation. Beim *Bptf/Fac1*-Phänotyp ist die Trophoblast-Zellpopulation reduziert, beim *Mash2*-Phänotyp hingegen ist sie vergrößert. Auch ähnelt der *Bptf/Fac1*-Phänotyp nicht dem *Hand1*-Phänotyp, obwohl der Zeitpunkt der Letalität ungefähr derselbe ist. Denn im Gegensatz zu *Bptf/Fac1*-Mutanten entwickeln sich die *Hand1*-Mutanten bis E7.5 normal, und erst dann wird der reduzierte Umfang des ekto-plazentalen Kegels sichtbar. Daher ist es unwahrscheinlich, daß *Bptf/Fac1* die Expression von *Mash2* und *Hand1* direkt reguliert.

Die genaue Funktion von *Bptf/Fac1* bei der Bildung des ekto-plazentalen Kegels bleibt unbekannt. Unmittelbar nach der Implantation ist die Isoform *Fac1* im gesamten ekto-plazentalen Kegel exprimiert. Diese Struktur fehlt jedoch in den homozygoten *Bptf/Fac1*-Mutanten. Es ist unwahrscheinlich, daß die *Fac1*-Expression im Zentrum des Epiblasts die Bildung des ekto-plazentalen Kegels beeinflusst, weil *Fac1* wie auch *Bptf* keine Morphogene sind und Bildungs- und Wirkungsort von *Fac1* durch das extraembryonale Ektoderm voneinander getrennt sind, so daß keine direkte Signalvermittlung stattfinden kann. Möglicherweise ist *Fac1* wichtig für das Überleben von diploiden Trophoblastzellen. Dann könnten eventuell gerade gebildete

Trophoblastzellen in den *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen unverzüglich Apoptose vollziehen, so daß gar kein sichtbarer ektoplazentaler Kegel entsteht. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Proliferationsrate der Trophoblastzellen in den *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen so stark herabgesetzt ist, daß an E5.5 nur sehr wenige Zellen existieren, die kaum detektiert werden können. Ein Hinweis darauf wäre, daß an E6.5 eine kleine *Mash2*-Domäne vorhanden ist. Dieses würde auf einen aktivierenden Einfluß von Bptf/Fac1 bei der Zellproliferation hindeuten. Scheinbar wäre dieses aber nicht im Einklang mit der Theorie, daß der NURF-Komplex eine Funktion in postmitotischen Zellen hat (Lazarro und Picketts, 2001). Aber möglicherweise ist hierbei eine Konkurrenz von FAC1 und BPTF um den Einbau in den NURF-Komplex zu berücksichtigen. An E5.5 wird nur die Isoform Fac1 gebildet und nur Fac1 könnte in den NURF-Komplex eingebaut werden. Eine entscheidende Frage hierbei wäre allerdings, ob die anderen Untereinheiten des NURF-Komplexes in diesem Embryonalstadium exprimiert werden.

6.7 Die Expression, aber nicht die Funktion von Bptf/Fac1 ist abhängig vom genetischen Hintergrund

Es wurde gezeigt, daß das Bptf/Fac1- β -Galactosidase-Fusionsprotein im gemischten CD1-Hintergrund homogene Expressionsdomänen aufweist und diese Domänen in den congenischen Hintergründen der Inzuchtstämme C57BL/6J und 129S2/SvHsd zunächst zwar identisch sind, aber beginnend um E10.5 bezüglich ihrer Struktur sehr heterogen sind. Im C57BL/6J- und im 129S2/SvHsd-Hintergrund geht die Expression in sämtlichen Domänen zwischen E10.5 und E16.5 zunehmend verloren. Pathologische Auswirkungen auf die Embryogenese sowie Bildung von Neuronen und Axonen konnten nicht nachgewiesen werden. Die Ursache für den rapiden Verlust der Expression ist unbekannt. Eine mögliche Ursache wäre ein Verlust der LacZ-positiven Zellen durch Apoptose. Dieses wäre in den betroffenen Geweben in dem beschriebenen Zeitraum allerdings ein unüblicher Vorgang. Hierfür gibt es auch keinerlei Hinweise, da - wie bereits erwähnt - keine Anomalien beobachtet wurden.

Im Gegensatz zur Expression sieht man beim Phänotyp der homozygoten Mutanten keine gravierenden Unterschiede in den verschiedenen genetischen Hintergründen.

Sowohl im gemischten CD1-Hintergrund als auch in den congenischen C57BL/6J- und 129S2/SvHsd-Hintergründen verläuft die Präimplantationsentwicklung normal und die frühe Postimplantationsentwicklung ist gekennzeichnet durch eine verzögerte Elongation aufgrund einer fehlenden Bildung des ekto-plazentalen Kegels an E5.5. Erst gegen Ende der Entwicklung der homozygoten Mutanten sind geringfügige Unterschiede festzustellen, nämlich daß die Entwicklung in der C57BL/6J-Linie noch stärker retardiert ist als in der CD1- und der 129S2/SvHsd-Linie. Diese Unterschiede sind aber darin begründet, daß die *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Embryonen der C57BL/6J-Linie den Kontakt zum maternalen Deciduum früher verlieren als in den anderen Linien. Die Funktion von *Bptf/Fac1* ist somit nicht abhängig vom genetischen Hintergrund.

6.8 Ein Ausblick – Weitere Möglichkeiten zur Analyse der Funktion von *Bptf/Fac1*

In dieser Dissertation wurde eine essentielle Funktion der Isoform *Fac1* bei der Bildung des ekto-plazentalen Kegels direkt nach der Implantation des Embryos in den Uterus aufgezeigt. Außerdem ist *Bptf/Fac1* für den korrekten zeitlichen Ablauf der Embryonalentwicklung zumindest bis zur Gastrulation bedeutend.

Eine Funktion von *Bptf/Fac1* zu späteren Zeitpunkten der Embryogenese, beispielsweise während der Bildung des zentralen Nervensystems, kann anhand der Gene Trap-Mauslinie A012C04 wegen der frühen Letalität nicht untersucht werden. Um eine neuronale oder andere Funktionen von *Bptf/Fac1* bei späteren Prozessen der Embryonalentwicklung zu analysieren, wäre eine konditionale Mutation des Gens angebracht, durch welche der frühe Postimplantationsphänotyp übersprungen werden kann. Möglicherweise könnte man dasselbe auch mit Hilfe chimärer Embryonen aus *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-Zellen der Mauslinie A012C04 und Wildtyp-Zellen erreichen, bei denen das Trophektoderm bzw. das extraembryonale Ektoderm und der ekto-plazentale Kegel von den Wildtyp-Zellen gebildet werden. Andererseits würden chimäre Embryonen mit einem hohen Anteil von *Bptf/Fac1*^{GT/GT}-ES-Zellen am Epiblast einen Hinweis darauf geben, ob die *Fac1*-exprimierenden Zellen des Epiblasts an E5.5 einen Einfluß auf die Bildung des ekto-plazentalen Kegels haben. Bilden solche Embryonen einen ekto-plazentalen Kegel, würde das darauf hindeuten,

daß auch in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Embryonen zu Beginn der Postimplantationsentwicklung an E4.5 bis eventuell E5.5 Trophoblast-Zellen und somit die Anlage für einen ekto-plazentalen Kegel vorhanden sein dürften. Für die Generierung von Chimären wäre es am günstigsten, eine homozygot mutante ES-Zelllinie zu generieren, die für eine Aggregation mit Wildtyp-Morulae oder eine Injektion in Wildtyp-Blastozysten eingesetzt werden kann. Die homozygot mutanten ES-Zellen könnten *de novo* aus Blastozysten gewonnen werden, die auf embryonalen Maus-Feeder-Zellen abgesetzt werden und auf diesen auswachsen. Alternativ könnte man tetraploide chimäre Embryonen durch die Elektrofusion von Wildtyp- und *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Zweizeller-Embryonen schaffen.

Eine *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-ES-Zelllinie würde genauso wie eine *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-TS-Zelllinie die Möglichkeit bieten, die Funktion des Genproduktes auf zellulärer Ebene zu beleuchten. TS-Zellen werden aus Blastozysten bzw. aus isolierten Trophoblasten von Embryonen des Stadiums E5.5 gewonnen, die ebenfalls auf embryonalen Maus-Feeder-Zellen in einem Fgf4-haltigen Medium kultiviert werden (Tanaka *et al.*, 1998). In solchen Zelllinien könnte man die Proliferationsraten, das Differenzierungspotential und das Apoptose-Verhalten analysieren. Dabei könnte zunächst der Frage nachgegangen werden, ob *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-TS-Zellen in Kultur nach Entzug von Fgf4 zu Trophoblast-Riesenzellen differenzieren können. Weiterhin könnte aus den *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Zellen die gesamte mRNA isoliert werden und für RT-PCR- oder Microarray-Analysen eingesetzt werden, um herauszufinden, welche Gene transkriptionell von Bptf/Fac1 reguliert werden. Darüber hinaus könnte die Chromatin-Struktur in *Bptf/Fac1^{GT/GT}*-Zellen untersucht werden, um weitere Informationen über die Funktion des NURF-Komplexes beim Nukleosomen-Remodelling zu erhalten. Um den Zusammenbau, die Regulation und die Funktion des NURF-Komplexes zu verstehen, wäre auch die Darstellung der Expressionsmuster der anderen Komponenten Snf2I, RbAP(p46) und RbAP(p48) von Interesse. Dafür kann in Embryonen und in Zellkulturen durch *In situ*-Hybridisierung beziehungsweise mit Hilfe spezifischer Antikörper eine Co-Lokalisation von Bptf/Fac1 mit den anderen Komponenten des NURF-Komplexes überprüft werden.

7 Literaturverzeichnis

Aasland R., Gibson T.J., Stewart A.F. (1995): The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biol. Sci.* 20: 56-59.

Aihara T., Miyoshi Y., Koyama K., Suzuki M., Takahashi E., Monden M., Nakamura Y. (1998): Cloning and mapping of SMARAC5 encoding hSNF2H, a novel human homologue of *Drosophila* ISWI. *Cytogenet. Cell. Genet.* 81: 191-193.

Ambrosetti D.C., Schöler H.R., Dailey L., Basilico C. (2000): Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the HMG and POU domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the FGF-4 enhancer. *J. Biol. Chem.* 275: 23387-23397.

Andersen E.C., Lu X., Horvitz H.R. (2006): *C. elegans* ISWI and NURF301 antagonize an Rb-like pathway in the determination of multiple cell fates. *Development* 133: 2695-2704.

Ansell J.D. und **Snow M. H.** (1975): The development of trophoblast in vitro from blastocysts containing varying amounts of inner cell mass. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 33: 117-185.

Anson-Cartwright L., Dawson K., Holmyard D., Fisher S.J., Lazzarini R.A., Cross J.C. (2000): The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat. Genet.* 25: 311-314.

Arman E., Haffner-Krausz R., Chen Y., Heath J.K., Lonai P. (1998): Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 5082-5087.

Ayer D.E. (1999): Histone deacetylases: Transcriptional repression with siners and nurds. *Trends Cell. Biol.* 9: 193-198.

Badenhorst P., Voas M., Rebay I., Wu C. (2002): Biological functions of the ISWI chromatin remodelling complex NURF. *Genes Dev.* 16: 3186-3198.

Barak O., Lazzaro M.A., Lane W.S., Speicher D.W., Picketts D.J., Shiekhatar R. (2003): Isolation of human NURF: a regulator of Engrailed gene expression. *EMBO J.* 22: 6089-6100.

Barbacci E., Reber M., Ott M.O., Breillat C., Huetz F., Cereghini S. (1999): Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* 126: 4795-4805.

Barlow P.W. und **Sherman M.I.** (1972): The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: studies on polyploidy. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27: 447-465.

Barlow P.W. und **Sherman M.I.** (1974): Cytological studies on the organization of DNA in giant trophoblast nuclei of the mouse and the rat. *Chromosoma* 47: 119-131.

Beck F., Erler T., Russell A., James R. (1995): Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev. Dyn.* 204: 219-227.

Beck S., le Good J.A., Guzman M., Ben Haim N., Roy K., Beermann F., Constam D.B. (2002): Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nat. Cell Biol.* 4: 981-985.

Beddington R.S. und **Robertson E.J.** (1999): Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* 96: 195-209.

Belo J.A., Bouwmeester T., Leyns L., Kertesz N., Gallo M., Follettie M., De Robertis E.M. (1997): Cerberus-like is a secreted factor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mech. Dev.* 68: 45-57.

Berezovska O., Xia M.Q., Page K., Wasco W., Tanzi R.E., Hyman B.T. (1997): Developmental regulation of presenilin mRNA expression parallels notch expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56: 40-44.

Bernstein B.E., Kamal M., Lindblad-Toh K., Bekiranov S., Bailey D.K., Huebert D.J., Mc Mahon S., Karlsson E.K., Kulbokas E.J. 3rd, Gingeras T.R., Schreiber S.L., Lander E.S. (2005): Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120 : 169-181.

Bevilacqua E.M., Katz S., Abrahamsohn P.A. (1985): Contact between trophoblast and antimesometrial decidual cells in the mouse. *Microsc. Electron. Biol. Celular* 9: 45-49.

Bevilacqua E.M.A.R. und **Abrahamsohn P.A.** (1988): Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during the invasive stage of implantation of the mouse embryo. *J. Morphol.* 198: 341-351.

Bevilacqua E.M. und **Abrahamsohn P.A.** (1989): Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. *Arch. Biol. Med. Exp. (Santiago)* 22: 107-118.

Biben C., Stanley E., Fabri L., Kotecha S., Rhinn M., Drinkwater C., Lah M., Wang C.C., Nash A., Hilton D., Ang S.L., Mohun, T., Harvey R.P. (1998): Murine cerberus homologue mCer-1: a candidate anterior patterning molecule. *Dev. Biol.* 194: 135-151.

Bielinska M., Narita N., Wilson D.B. (1999): Distinct roles for visceral endoderm during embryonic mouse development. *Int. J. Dev. Biol.* 43: 183-205.

Bienz M. (2006): The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem. Sci.* 31: 35-40.

Bochar D.A., Savard J., Wang W., Lafleur D.W., Moore P., Cote J., Shiekhattar R. (2000): A family of chromatin remodeling factors related to Williams syndrome transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 1038-1043.

Bowser R., Giambrone A., Davies P. (1995): FAC1, a novel gene identified by the monoclonal antibody Alz50, is developmentally regulated in human brain. *Dev Neuroscience* 17: 20-37.

Bowser R., Reilly S. (1998): Expression of FAC1 in activated microglia during Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 253: 163-166.

Brennan J., Lu C.C., Norris D.P., Rodriguez T.A., Beddington R.S.P., Robertson E.J. (2001): Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo. *Nature* 411: 965-969.

Brison D.R. und **Schultz** R.M. (1997): Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol. Reprod.* 56: 1088-1096.

Carney E.W., Prideaux V., Lye S.J., Rossant J. (1993): Progressive expression of trophoblast-specific genes during formation of mouse trophoblast giant cells in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 34: 357-368.

Chawengsaksophak K., James R., Hammond V.E., Kontgen F., Beck F. (1997): Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 386: 84-87.

Chen W.S., Manova K., Weinstein D.C., Duncan S.A., Plump A.S., Prezioso V.R., Bachvarova R.F., Darnell J.E. Jr. (1994): Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev.* 8: 2466-2477.

Cheng A.M., Saxton T., Sakai M., Kulkarni R.S., Mbamalu G., Vogel W., Tortorice C.G., Cardiff R.D., Cross J.C., Muller W.J., Pawson T. (1998): Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell* 95: 793-803.

Coffinie C., Thepot D., Babinet C., Yaniv M., Barra J. (1999): Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development* 126: 4785-4794.

Colosi P., Swiergiel J.J., Wilder E.L., Oviedo A., Linzer D.I. (1988): Characterization of proliferin-related protein. *Mol. Endocrinol.* 2: 579-586.

Copp A.J. (1979): Interaction between inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. II. The fate of the polar trophectoderm. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 51: 109-120.

Cormier S., Vandormael-Pournin S., Babinet C., Cohen-Tannoudji M. (2004): Developmental expression of the Notch signaling pathway genes during mouse preimplantation development. *Gene Expr. Patterns* 4: 713-717.

Coucouvannis E. und **Martin G.R.** (1995): Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* 83: 279-287.

Coucouvannis E. und **Martin G.R.** (1999): BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development* 126: 535-546.

Cross J.C., Werb Z., Fisher S.J. (1994): Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266: 1508-1518.

Cross J.C., Flannery M.L., Blonar M.A., Steingrimsson E., Jenkins N.A., Copeland N.G., Rutter W.J., Werb Z. (1995): Hxt encodes a basic helix-loop-helix transcription factor that regulates trophoblast cell development. *Development* 121: 2513-2523.

Cross J.C. (2000): Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11: 105-113.

Cserjesi P., Brown D., Lyons G.E., Olson E.N. (1995): Expression of the novel basic helix-loop-helix gene *eHAND* in neural crest derivatives and extraembryonic membranes during mouse development. *Dev. Biol.* 170: 664-678.

Dannenberg J.H., David G., Zhong S., van der Torre J., Wong W.H., DePinho R.A. (2005): mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. *Genes Dev.* 19: 1581-1595.

Das S.K., Yano S., Wang J., Edwards D., Nagase H., Dey S.K. (1997): Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Dev. Gene* 21: 44-54.

Deb S., Faria T.N., Roby K.F., Larsen D., Kwok S.C., Talamantes F., Soares M.J. (1991): Identification and characterization of a new member of the prolactin family, placental lactogen-I variant. *J. Biol. Chem.* 266: 1605-1610.

Di Croce L., Koop R., Venditti P., Westphal H.M., Nightingale K.P., Corona D.F., Becker P.B., Beato M. (1999): Two-step synergism between the progesterone receptor and the DNA-binding domain of nuclear afctor 1 on MMTV minichromosomes. *Mol. Cell* 4: 45-54.

Doerks T., Copley R., Bork P. (2001): DDT – a novel domain in different transcription and chromosome remodeling factors. *Trends Biochem. Sci.* 26: 145-146.

Donoviel D.B., Hadjantonakis A.K., Ikeda M., Zheng H., St George Hyslop P., Bernstein A. (1999): Mice lacking both presenilin genes exhibit early patterning defects. *Genes Dev.* 13: 2801-2810.

Dziadek M. (1978). Modulation of alphafetoprotein synthesis in the early postimplantation mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 46: 135-146.

Farese R.V. Jr., Ruland S.L., Flynn L.M., Stokowski R.P., Young S.G. (1995): Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 1774-1778.

Farese R.V. Jr. und Herz J. (1998): Cholesterol metabolism and embryogenesis. *Trends Genet.* 14: 115-120.

Faria T.N., Ogren L., Talamantes F., Linzer D.I., Soares M.J. (1991): Localization of placental lactogen-I in trophoblast giant cells of the mouse placenta. *Biol. Reprod.* 44: 327-331.

Feldman B., Poueymirou W., Papaioannou V.E., DeChiara T.M., Goldfarb, M. (1995): Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* 267: 246-249.

Firulli A.B., McFadden D.G., Lin Q., Srivastava D., Olson E.N. (1998): Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1. *Nat. Genet.* 18: 266-270.

Fishburn C.S., Bedford M., Lonai P., Fuchs S. (1996): Early expression of D3 dopamine receptors in murine embryonic development. *FEBS Letters* 381: 257-261.

Fisher S., Gearhart J.D., Oster-Granite M.L. (1991): Expression of the amyloid precursor protein gene in mouse oocytes and embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 1779-1782.

Gardner R.L. und **Johnson** M.H. (1972): An investigation of inner cell mass and trophoblast tissues following their isolation from the mouse blastocyst. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 28: 279-312.

Gardner R.L., Papaioannou J.E., Barton S.C. (1973): Origin of the ectoplacental cone and secondary giant cells in mouse blastocysts reconstituted from isolated trophoblast and inner cell mass. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 30: 561-572.

Genbacev O., Zhou Y., Ludlow J.W., Fisher S.J. (1997): Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277: 1669-1672.

Goldin S.N. und **Papaioannou** V.E. (2003): Paracrine action of FGF4 during periimplantation development maintains trophectoderm and primitive endoderm. *Genesis* 36: 40-47.

Goldstein L.S., Spindle A.I., Pedersen R.A. (1975): X-ray sensitivity of the preimplantation mouse embryo in vitro. *Radiat. Res.* 62: 276-287.

Gonzales D.S., Boatman D.E., Bavister B.D. (1996 I): Kinematics of trophectoderm projections and locomotion in the peri-implantation hamster blastocyst. *Dev. Dyn.* 205: 435-444.

Gonzales D.S., Jones J.M., Pinyopummintr T., Carnevale E.M., Ginther O.J., Shapiro S.S., Bavister B.D. (1996 II): Trophectoderm projections: A potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts. *Hum. Reprod.* 11: 2739-2745.

Gotoh N., Manova K., Tanaka S., Murohashi M., Hadari Y., Lee A., Hamada Y., Hiroe T., Ito M., Kurihara T. et al. (2005). The docking protein FRS2{a} is an essential component of multiple fibroblast growth factor responses during early mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 25: 4105-4116.

Grummer R., Hellmann P., Traub O., Soares M.J., el-Sabban M.E., Winterhager E. (1996): Regulation of connexin31 gene expression upon retinoic acid treatment in rat choriocarcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* 227: 23-32.

Gueth-Hallonet C., Santa-Maria A., Verroust P., Maro B. (1994): Gp330 is specifically expressed in outer cells during epithelial differentiation in the preimplantation mouse embryo. *Development* 120: 3289-3299.

Guillemot F., Nagy A., Auerbach A., Rossant J., Joyner A.L. (1994): Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature* 371: 333-336.

Guillemot F., Caspary T., Tilghman S.M., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Anderson D.J., Joyner A.L., Rossant J., Nagy A. (1995): Genomic imprinting of Mash2, a mouse gene required for trophoblast development. *Nat. Genet.* 9: 235-241.

Guzman-Ayala M., Ben-Haim N., Beck S., Constam D.B. (2004): Nodal protein processing and fibroblast growth factor 4 synergize to maintain a trophoblast stem cell microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 15656-15660.

Haffner-Krausz R., Gorivodsky M., Chen Y., Lonai P. (1999): Expression of Fgfr2 in the early mouse embryo indicates its involvement in preimplantation development. *Mech. Dev.* 85: 167-172.

Hall J. und Talamantes F. (1984): Immunocytochemical localization of mouse placental lactogen in the mouse placenta. *J. Histochem. Cytochem.* 32: 379-382.

Hamiche A., Sandaltzopoulos R., Gdula D.A., Wu C. (1999): ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF. *Cell* 97: 833-842.

Hamiche A., Kang J.G., Dennis C., Xiao H., Wu C. (2001): Histone tails modulate nucleosome mobility and regulate ATP-dependent nucleosome sliding by NURF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 14316-14321.

Hamlin G.P., Lu X.J., Roby K.F., Soares M.J. (1994): Recapitulation of the pathway for trophoblast giant cell differentiation in vitro: Stage-specific expression of members of the prolactin gene family. *Endocrinology* 134: 2390-2396.

Hancock S.N., Agulnik S.I., Silver L.M., Papaioannou V.E. (1999): Mapping and expression analysis of the mouse ortholog of *Xenopus* eomesodermin. *Mech. Dev.* 81: 205-208.

Haynes S.R., Dollard C., Winston F., Beck S., Trowsdale J., Dawid I.B. (1992): The bromodomain: a conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucl. Acid Res.* 20: 2603.

Herz J., Clouthier D.E., Hammer R.E. (1992): LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 71: 411-421.

Herz J., Clouthier D.E., Hammer R.E. (1993): Erratum in: LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPAPAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 73: 428.

Herz J. und **Farese R.V. Jr.** (1999): The LDL receptor gene family, apolipoprotein B and cholesterol in embryonic development. *J. Nutr.* 129: 473S-475S.

Hitoshi S., Alexson T., Tropepe V., Donoviel D., Elia A.J., Nye J.S., Conlon R.A., Mak T.W., Bernstein A., van der Kooy D. (2002): Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev.* 16: 846-858.

Hoffman L.H. und **Wooding F.B.** (1993): Giant and binucleate trophoblast cells of mammals. *J. Exp. Zool.* 266: 559-577.

Hogan B.L. und **Tilly R.** (1981): Cell interactions and endoderm differentiation in cultured mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 62: 379-394.

Hogan B., **Beddington R.**, **Costantini F.** und **Lacy F.** (1994): Manipulating the mouse embryo – A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 2nd edition: 19-105.

Hollenberg S.M., Sternglanz R., Cheng P.F., Weintraub H. (1995): Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol. Cell. Biol.* 15: 3813-3822.

Huang L.S., Voyiaziakis E., Markenson D.F., Sokol K.A., Hayek T., Breslow J.L. (1995): apo B gene knockout in mice results in embryonic lethality in homozygotes and neural tube defects, male infertility, and reduced HDL cholesterol ester and apo A-I transport rates in heterozygotes. *J. Clin. Invest.* 96: 2152-2161.

Huang Y., Myers S.J., Dingle R. (1999): Transcriptional repression by REST: Recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes. *Nat. Neurosci.* 8: 67-72.

Ito T., Bulger M., Pazin M.J., Kobayashi R., Kadonaga J.T. (1997): ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* 90: 145-155.

Jacobs Y., Vierra C., Nelson C. (1993): E2A expression, nuclear localization, and in vivo formation of DNA- and non-DNA-binding species during B-cell development. *Mol. Cell Biol.* 13: 7321-7333.

Jiang B., Kamat A., Mendelson C.R. (2000): Hypoxia prevents induction of aromatase expression in human trophoblast cells in culture: potential inhibitory role of the hypoxia-inducible transcription factor Mash-2 (mammalian Achaete-Scute homologous protein-2). *Mol. Endocrinol.* 14: 1661-1673.

Jicha G.A., Bowser R., Kazam I.G., Davies P. (1997): Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J. Neurosci. Res.* 48: 128-132.

Johnson J.E., Birren S.J., Saito T., Anderson D.J. (1992): DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (MASH) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 3596-3600.

Jones M.H., Hamana N., Shimane M. (2000): Identification and characterization of BPTF, a novel bromodomain transcription factor. *Genomics* 63: 35-39.

Jordan-Sciutto K.L., Dragich J.M., Rhodes J.L., Bowser R. (1999 I): Fetal Alz-50 clone 1, a novel zinc finger protein, binds a specific DNA sequence and acts as a transcriptional regulator. *J. Biol. Chem.* 274: 35262-35268.

Jordan-Sciutto K.L., Dragich J.M., Bowser R. (1999 II): DNA binding activity of the Fetal Alz-50 Clone 1 (FAC1) protein is enhanced by phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res.* 260: 785-789.

Jordan-Sciutto K.L., Dragich J.M., Caltagarone J., Hall D.J., Bowser R. (2000): Fetal Alz-50 Clone 1 (FAC1) protein interacts with the myc-associated zinc finger protein (ZF87/MAZ) and alters its transcriptional activity. *Biochemistry* 39: 3206-3215.

Kaufmann E., Hoch M., Jackle H. (1994): The interaction of DNA with the DNA-binding domain encoded by the *Drosophila* gene fork head. *Eur. J. Biochem.* 223: 329-337.

Kimura C., Yoshinaga K., Tian E., Suzuki M., Aizawa S., Matsuo I. (2000): Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals. *Dev. Biol.* 225: 304-321.

Kingston R.E. und **Narlikar** G.J. (1999): ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 13: 2339-2352.

Knoblich J.A., Sauer K., Jones L., Richardson H., Saint R., Lehner C.F. (1994): Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* 77: 107-120.

Knoepfler P.S. und **Eisenman** R.N. (1999): Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 99: 447-450.

Koipally J., Renold A., Kim J., Georgopoulos K. (1999): Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO J.* 18: 3090-3100.

Kornberg R.D. und **Lorch** Y. (1999): Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 148-151.

Koutsourakis M., Langeveld A., Patient R., Beddington R., Grosveld F. (1999): The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development* 126: 723-732.

Ksiezak-Reding H., Leibowitz R.L., Bowser R., Davies P. (1995): Binding of ALZ 50 depends on Phe8 in tau synthetic peptides and varies between native and denatured tau proteins. *Brain Res.* 697: 63-75.

Lastowska M., Van Roy N., Brown N., Speleman F., Roberts P., Lunec J., Strachan T., Pearson A.D., Jackson M.S. (2001): Molecular cytogenetic definition of 17q translocation breakpoints in neuroblastoma. *Med. Pediatr. Oncol.* 36: 20-23.

Lazzaro M.A. und **Picketts D.J.** (2001): Cloning and characterization of the murine Imitation Switch (ISWI) genes: differential expression patterns suggest distinct developmental roles for Snf2h and Snf2l. *J. Neurochem.* 77: 1145-1156.

Lee M.K., Slunt H.H., Martin L.J., Thinakaran G., Kim G., Gandy S.E., Seeger M., Koo E., Price D.L., Sisodia S.S. (1996): Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J. Neurosci.* 16: 7513-7525.

Lee S.J., Talamantes F., Wilder E., Linzer D.I., Nathans D. (1988): Trophoblastic giant cells of the mouse placenta as the site of proliferin synthesis. *Endocrinology* 122: 1761–1768.

LeRoy G., Orphanides G., Lane W.S., Reinberg D. (1998): Requirement of RSF and FACT for transcription of chromatin templates in vitro. *Science* 282: 1900-1904.

LeRoy G., Loyola A., Lane W.S., Reinberg D. (2000): Purification and characterization of a human factor that assembles and remodels chromatin. *J. Biol. Chem.* 275: 14787-14790.

Levitan D., Lee J., Song L., Manning R., Wong G., Parker E., Zhang L. (2001): PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 12186-12190.

Li H., Ilin S., Wang W., Duncan E.M., Wysocka J., Allis C.D., Patel D.J. (2006): Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* 442: 91-95.

Lilly M. und **Spradling A.C.** (1996): The *Drosophila* endocycle is controlled by cyclin E and lacks a checkpoint insuring S-phase completion. *Genes Dev.* 10: 2514-2526.

Lin J., Poole J., Linzer D. I. (1997 I): Two novel members of the prolactin/growth hormone family are expressed in the mouse placenta. *Endocrinology* 138: 5535-5540.

Lin J., Poole J., Linzer D.I. (1997 II): Three new members of the mouse prolactin/growth hormone family are homologous to proteins expressed in the rat. *Endocrinology* 138: 5541-5549.

Linzer D.I., Lee S.J., Ogren L., Talamantes F., Nathans D. (1985): Identification of proliferin mRNA and protein in mouse placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 4356-4359.

Linzer D.I. und **Nathans D.** (1985): A new member of the prolactin-growth hormone gene family expressed in mouse placenta. *EMBO J.* 4: 1419-1423.

Lu C.C., Brennan J., Robertson E.J. (2001). From fertilization to gastrulation: Axis formation in the mouse embryo. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 384-392.

Luo J., Sladek R., Bader J.A., Matthyssen A., Rossant J., Giguere V. (1997): Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR- β . *Nature* 388: 778-782.

Martinez-Balbas M.A., Tsukiyama T., Gdula D., Wu C. (1998): *Drosophila* NURF-55, a WD repeat protein involved in histone metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 132-137.

Maye P., Becker S., Kasameyer E., Byrd N., Grabel L. (2000): Indian hedgehog signaling in extraembryonic endoderm and ectoderm differentiation in ES embryoid bodies. *Mech. Dev.* 94: 117-132.

McAuley A., Cross J.C., Werb Z. (1998): Reprogramming the cell cycle for endoreduplication in rodent trophoblast cells. *Mol. Biol. Cell.* 9: 795-807.

McLaughlin K.J., Szabo P., Haegel H., Mann J.R. (1996): Mouse embryos with paternal duplication of an imprinted chromosome 7 region die at midgestation and lack placental spongiotrophoblast. *Development* 122: 265-270.

Mitchell P.J., Timmons P.M., Hébert J.M., Rigby P.W., Tjian R., Wilkinson D.G. (1992): Whole-mount in Situ Hybridization of Vertebrate Embryos. *IRL Press, Oxford*.

Moehlmann T., Winkler E., Xia X., Edbauer D., Murrell J., Capell A., Kaether C., Zheng H., Ghetti B., Haass C., Steiner H. (2002): Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on A β 42 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 8025-8030.

Morrissey E.E., Tang Z., Sigrist K., Lu M.M., Jiang F., Ip H.S., Parmacek M.S. (1998): GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* 12: 3579-3590.

Mu X., Springer J.E., Bowser R. (1997): FAC1 expression and localization in motor neurons of developing, adult and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *Exp. Neurol.* 146: 17-24.

Murphy M., Ahn J., Walker K.K., Hoffman W.H., Evans R.M., Levine A.J., George D.L. (1999): Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev.* 13: 2490-2501.

Nakayama H., Liu Y., Stifani S., Cross J.C. (1997): Developmental restriction of Mash-2 expression in trophoblast correlates with potential activation of the NOTCH-2 pathway. *Dev. Genet.* 21: 21-30.

Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Schöler H., Smith A. (1998): Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct-4. *Cell* 95: 379-391.

Niswander L. und **Martin G.R.** (1992): Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development* 114: 755-768.

Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. (2000): Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24: 1-5.

Norris D.P., Brennan J., Bikoff E.K., Robertson E.J. (2002): The Foxh1-dependent autoregulatory enhancer controls the level of Nodal signals in the mouse embryo. *Development* 129: 3455-3468.

Ogren L. und **Talamantes F.** (1988): Prolactins of pregnancy and their cellular source. *Int. Rev. Cytol.* 112: 1-65.

Ohgane J., Aikawa J., Ogura A., Hattori N., Ogawa T., Shiota K. (1998): Analysis of CpG islands of trophoblast giant cells by restriction landmark genomic scanning. *Dev. Genet.* 22: 132-140.

Okada M. und **Hirose S.** (1998): Chromatin remodeling mediated by *Drosophila* GAGA factor and ISWI activates fushi tarazu gene transcription in vitro. *Mol. Cell Biol.* 18: 2455-2461.

Orr-Urtreger A., Givol D., Yayon A., Yarden Y., Lonai P. (1991): Developmental expression of two murine fibroblast growth factor receptors, flg and bek. *Development* 113: 1419-1434.

Ott M.O. und Bullock S.L. (2001): A gene trap insertion reveals that amyloid precursor protein expression is a very early event in murine embryogenesis. *Dev. Genes Evol.* 211: 355-357.

Overdier D., Porcella A., Costa R. (1994): The DNA-binding specificity of the hepatocyte nuclear factor 3/forkehead domain is influenced by amino-acid residues adjacent to the recognition helix. *Mol. Cell Biol.* 14: 2755-2766.

Palmieri S.L., Peter W., Hess H., Scholer H.R. (1994): Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of first two extra-embryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol.* 166: 259-267.

Pampfer S. und Donnay I. (1999): Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat. *Cell Death Differ.* 6: 533-545.

Pappano W.N., Scott I.C., Clark T.G., Eddy R.L., Shows T.B., Greenspan D.S. (1998): Coding sequence and expression patterns of mouse chordin and mapping of the cognate mouse Chrd and human CHRD genes. *Genomics* 52: 236-239.

Parast M.M., Aeder S., Sutherland A.E. (2001): Trophoblast giant-cell differentiation involves changes in cytoskeleton and cell motility. *Dev. Biol.* 230: 43-60.

Perea-Gomez A., Shawlot W., Sasaki H., Behringer R.R., Ang S.L. (1999): HNF3 β and Lim1 interact in the visceral endoderm to regulate primitive streak formation and anterior-posterior polarity in the mouse embryo. *Development* 126: 4499-4511.

Perea-Gomez A., Rhinn M., Ang S.L. (2001): Role of the anterior visceral endoderm in restricting posterior signals in the mouse embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 45: 311-320.

Perea-Gomez A., Vella F.D., Shawlot W., Oulad-Abdelghani M., Chazaud C., Meno C., Pfister V., Chen L., Robertson E., Hamada H. et al. (2002): Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks. *Dev. Cell* 3: 745-756.

Perea-Gomez A., Camus A., Moreau A., Grieve K., Moneron G., Dubois A., Cibert C., Collignon J. (2004) : Initiation of gastrulation in the mouse embryo is preceded by an apparent shift in the orientation of the anterior-posterior axis. *Curr. Biol.* 14: 197–207.

Peterson C.L. und **Workman J.L.** (2000): Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 187-192.

Pettersson K., Svensson K., Mattsson R., Carlsson B., Ohlsson R., Berkenstam A. (1996): Expression of a novel member of estrogen response element-binding nuclear receptors is restricted to the early stages of chorion formation during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 54: 211-223.

Pokholok D.K., Harbinson C.T., Levine S., Cole M., Hannett N.M., Lee T.I., Bell G.W., Walker K., Rolfe P.A., Herbolsheimer E., Zeitlinger J., Lewitter F., Gifford D.K., Young R.A. (2005): Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122: 517-527.

Poot R.A., Dellaire G., Hulsman B.B., Grimaldi M.A., Corona D.F., Becker P.B., Bickmore W.A., Varga-Weisz P.D. (2000): HuCHRAc, a human ISWI chromatin remodeling complex contains hACF1 and two novel histone-fold proteins. *EMBO J.* 19: 3377-3387.

Potts D. M. (1968): The ultrastructure of implantation in the mouse. *J. Anat.* 103: 77-90.

Przemeck G.K.H., Heinzmann U., Beckers J., Hrabe de Angelis M. (2003): Node and midline defects are associated with left-right development in Delta1 mutant embryos. *Development* 130: 3-13.

Ragvin A., Valvante H., Erdal S., Arskog V., Tufteland K.R., Breen K., Øyan A.M., Eberharder A., Gibson T.J., Becker P.B., Aasland R. (2004): Nucleosome binding by the bromodomain and PHD finger of the transcriptional cofactor p300. *J. Mol. Biol.* 337: 773-788.

Rappolee D.A., Basilico C., Patel Y., Werb Z. (1994): Expression and function of FGF-4 in peri-implantation development in mouse embryos. *Development* 120: 2259-2269.

Ray W.J., Yao M., Nowotny P., Mumm J., Zhang W., Wu J.Y., Kopan R., Goate A.M. (1999): Evidence for a physical interaction between presenilin and Notch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 3263-3268.

Rayman J.B., Takahashi Y., Indjeian V.B., Dannenberg J.H., Catchpole S., Watson R.J., te Riele H., Dynlacht B.D. (2002): E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev.* 16: 933-947.

Rechsteiner M. und **Rogers** S.W. (1996): PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 1: 267-271.

Reuss B., Hellmann P., Dahl E., Traub O., Butterweck A., Grummer R., Winterhager, E. (1996): Connexins and E-cadherin are differentially expressed during trophoblast invasion and placenta differentiation in the rat. *Dev. Dyn.* 205: 172-182.

Rhodes J., Lutka F.A., Jordan-Sciutto K.L., Bowser R. (2003): Altered expression and distribution of FAC1 during NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells. *Neuroreport* 14: 449-452.

Riley P., Anson-Cartwright L., Cross J.C. (1998): The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat. Genet.* 18: 271-275.

Rinkenberger J.L., Cross J.C., Werb Z. (1997): Molecular genetics of implantation in the mouse. *Dev. Genet.* 21: 6-20.

Rivera-Perez J.A., Mager J., Magnuson T. (2003): Dynamic morphogenetic events characterize the mouse visceral endoderm. *Dev. Biol.* 261: 470-487.

Roncarati R., Sestan N., Scheinfeld M.H., Berechid B.E., Lopez P.A., Meucci O., McGlade J.C., Rakic P., D'Adamio L. (2002): The gamma-secretase-generated intracellular domain of β -amyloid precursor protein binds Numb and inhibits Notch signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 7102-7107.

Rossant J. (1995): Development of the extraembryonic lineages. *Semin. Dev. Biol.* 6: 237-247.

Rossant J., Guillemot F., Tanaka M., Latham K., Gertenstein M., Nagy A. (1998): Mash2 is expressed in oogenesis and preimplantation development but is not required for blastocyst formation. *Mech. Dev.* 73: 183-191.

Rossant J. (2001). Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells* 19: 477-482.

Rossant J. und **Cross J.C.** (2001): Placental development: Lessons from mouse mutants. *Nat. Rev. Genet.* 2: 538-548.

Rossant J., Chazaud C., Yamanaka Y. (2003) : Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 358: 1341-1348, discussion 1349.

Russ A.P., Wattler S., Colledge W.H., Aparicio S.A.J.R., Carlton M.B.L., Pearce J.J., Barton S.C., Surani M.A., Ryan K., Nehls M.C., Wilson V., Evans M.J. (2000): Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* 404: 95-99.

Salbaum J.M. und **Ruddle F.H.** (1994): Embryonic expression pattern of amyloid protein precursor suggests a role in differentiation of specific subsets of neurons. *J. Exp. Zool.* 269: 116-127.

Santos-Rosa H., Schneider R., Bannister A.J., Sherrieff J., Bernstein B.E., Emre N.C., Schreiber S.L., Mellor J., Kouzarides T. (2002): Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419: 407-411.

Sauer K., Knoblich J.A., Richardson H., Lehner C.F. (1995): Distinct modes of cyclin E/cdc2c kinase regulation and S-phase control in mitotic and endoreduplication cycles of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev.* 9: 1327-1339.

Schneider R., Bannister A.J., Myers F.A., Thorne A.W., Crane-Robinson C., Kouzarides T. (2004): Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nature Cell Biol.* 6: 73-77.

Scholer H.R., Dressler G.R., Balling R., Rohdewohld H., Gruss P. (1990): Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J.* 9: 2185-2195.

Schoonover S., Davies P., Bowser R. (1996): Immunolocalization and redistribution of the FAC1 protein in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55: 444-455.

Schreiber-Agus N. und **DePinho R.A.** (1998): Repression by the mad(mx1)-sin3 complex. *Bioessays* 20: 808-818.

Schwanbeck R., Xiao H., Wu C. (2004): Spatial contacts and nucleosome step movements induced by the NURF chromatin remodeling complex. *J. Biol. Chem.* 279: 39933-39941.

Scott I.C., Cross J.C. (1996): Basic helix-loop-helix factors HXT and MASH-2 have distinct expression patterns and partner preferences during murine trophoblast development. *Biol. Reprod.* 54 (suppl1):176.

Scott I.C., Anson-Cartwright L., Riley P., Reda D., Cross J.C. (2000): The HAND1 basic helix-loop-helix transcription factor regulates trophoblast differentiation via multiple mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 20: 530-541.

Silverstein R.A. und **Ekwall K.** (2004): Sin3: A flexible regulator of global gene expression and genome instability. *Curr. Genet.* 47: 1-17.

Smyth N., Vatansever H.S., Murray P., Meyer M., Frie C., Paulsson M., Edgar D. (1999): Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J. Cell Biol.* 144: 151-160.

Snow M.H. und **Ansell J. D.** (1974): The chromosomes of giant trophoblast cells of the mouse. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 187: 93-98.

Soudais C., Bielinska M., Heikinheimo M., McArthur C.A., Narita N., Saffitz J.E., Simon M.C., Leiden J.M., Wilson D.B. (1995): Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation in vitro. *Development* 121: 3877-3888.

Southard J. N. und **Talamantes F.** (1991): Placental prolactin-like proteins in rodents: Variations on a structural theme. *Mol. Cell. Endocrinol.* 79: C133-C140.

Spyropoulos D.D. und **Capecchi M.R.** (1994): Targeted disruption of the even-skipped gene, *evx1*, causes early postimplantation lethality of the mouse conceptus. *Genes Dev.* 8: 1949-1961.

Srinivias S., Rodriguez T., Clements M., Smith J.C., Beddington R.S. (2004): Active cell migration drives the unilateral movements of the anterior visceral endoderm. *Development* 131: 1157-1164.

Stecca B., Nait-Oumesmar B., Kelley K.A., Voss A.K., Thomas T., Lazzarini R.A. (2002): *Gcm1* expression defines three stages of chorio-allantoic interaction during placental development. *Mech. Dev.* 115: 27-34.

Stepan H., Marquardt W., Kuhn Y., Höckel M., Schultheiss H.P., Walther T. (2003): Structure and regulation of the murine *Mash2* gene. *Biol. Repr.* 68: 40-44.

Strachan G.D., Morgan K.L., Otis L.L., Caltagarone J., Gittis A., Bowser R., Jordan-Sciutto K.L. (2004): Fetal *Alz-50* Clone 1 interacts with the human orthologue of the Kelch-like E2f-associated protein. *Biochemistry* 43: 12113-12122.

Styren S.D., Bowser R., Dekosky S.T. (1997): Expression of fetal Alz-50 reactive clone 1 (FAC1) in dentate gyrus following entorhinal cortex lesion. *J. Comp. Neurol.* 386: 555-561.

Sutherland A.E., Calarco P.G., Damsky C.H. (1988): Expression and function of cell surface extracellular matrix receptors in mouse blastocyst attachment and outgrowth. *J. Cell. Biol.* 106: 1331-1348.

Tamai Y., Nakajima R., Ishikawa T., Takaku K., Seldin M.F., Taketo M.M. (1999): Colonic hamartoma development by anomalous duplication in Cdx2 knockout mice. *Cancer Res.* 59: 2965-2970.

Tanaka M., Gertsenstein M., Rossant J., Nagy A. (1997): Mash2 acts cell autonomously in mouse spongiotrophoblast development. *Dev. Biol.* 190: 55-65.

Tanaka S., Kunath T., Hadjantonakis A.K., Nagy A., Rossant J. (1998): Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 282: 2072-2075.

Tanaka M., Puchyr M., Gertsenstein M., Harpal K., Jaenisch R., Rossant J., Nagy A. (1999): Parental origin-specific expression of Mash2 is established at the time of implantation with its imprinting mechanism highly resistant to genomewide demethylation. *Mech. Dev.* 87: 129-142.

Teesalu T., Masson R., Basset P., Blasi F., Talarico D. (1999): Expression of matrix metalloproteinases during chorioallantoic placenta maturation. *Dev. Dyn.* 21: 248-258.

Terasawa Y., Cases S.J., Wong J.S., Jamil H., Jothi S., Traber M.G., Packer L., Gordon D.A., Hamilton R.L., Farese R.V. Jr. (1999): Apolipoprotein B-related gene expression and ultrastructural characteristics of lipoprotein secretion in mouse yolk sac during embryonic development. *J. Lipid Res.* 40: 1967-1977.

Thomas P. und **Beddington R.** (1996): Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr. Biol.* 6: 1487-1496.

Thomas P.Q., **Brown A.**, **Beddington R.S.** (1998): Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development* 125: 85-94.

Toft D.J. und **Linzer D.I.** (1999): Prolactin (PRL) -like protein J, a novel member of the PRL/growth hormone family, is exclusively expressed in maternal decidua. *Endocrinology* 140: 5095-5101.

Tremblay G.B., **Kunath T.**, **Bergeron D.**, **Lapointe L.**, **Champigny C.**, **Bader J.A.**, **Rossant J.**, **Giguere V.** (2001): Diethylstilbestrol regulates trophoblast stem cell differentiation as a ligand of orphan nuclear receptor ERR beta. *Genes Dev.* 15: 833-838.

Tsukiyama T. und **Wu C.** (1995): Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell* 83: 1011-1020.

Tsukiyama T., **Daniel C.**, **Tamkun J.**, **Wu C.** (1995): ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140kD subunit of the nucleosome remodeling factor. *Cell* 83: 1021-1026.

Uy G.D., **Downs K.M.**, **Gardner R.L.** (2002): Inhibition of trophoblast stem cell potential in chorionic ectoderm coincides with occlusion of the ectoplacental cavity in the mouse. *Development* 129: 3913-3924.

Varga-Weisz P.D., **Wilm M.**, **Bonte E.**, **Dumas K.**, **Mann M.**, **Becker P.B.** (1997): Chromatin remodeling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature* 388: 598-602.

Varga-Weisz P.D. und **Becker P.B.** (1998): Chromatin-remodeling factors: machines that regulate? *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 346-353.

Varmuza S., Prideaux V., Kothary R., Rossant J. (1988): Polytene chromosomes in mouse trophoblast giant cells. *Development* 102: 127-134.

Voronova A. und **Baltimore D.** (1990): Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 4722-4726.

Voronova A.F., Lee F. (1994): The E2A and tal-1 helix-loop-helix proteins associate in vivo and are modulated by Id proteins during interleukin 6-induced myeloid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 5952-5956.

Waldrip W.R., Bikoff E.K., Hoodless P.A., Wrana J.L., Robertson E.J. (1998): Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell* 92: 797-808.

Weintraub H. (1993): The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75: 1241-1244.

Welsh A.O. und **Enders A.C.** (1987): Trophoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of the rat. *Anat. Rec.* 217: 203-219.

Whitman M. (2001): Nodal signaling in early vertebrate embryos: themes and variations. *Dev. Cell.* 1: 605-617.

Wilder E.L. und **Linzer D.I.** (1986): Expression of multiple proliferin genes in mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 6: 3283–3286.

Wiles M.V., Vauti F., Otte J., Fuchtbauer E.M., Ruiz P., Fuchtbauer A., Arnold H.H., Lehrach H., Metz T., von Melchner H., Wurst W. (2000): Establishment of a gene-trap sequence tag library to generate mutant mice from embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 24: 13-4.

Wilkinson D.G., Bhatt S., Herrmann B.G. (1990): Expression pattern of the mouse *T* gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 343: 657-659.

Willnow T.E., Hilpert J., Armstrong S.A., Rohlmann A., Hammer R.E., Burns D.K., Herz J. (1996): Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 8460–8464.

Winnier G., Blessing M., Labosky P.A., Hogan B.L. (1995): Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 9: 2105-2116.

Winterhager E., Kaufmann P., Gruemmer R. (2000): Cell-cell communication during placental development and possible implications for trophoblast proliferation and differentiation. *Placenta* 21 (Suppl. A): S61–S68.

Wong P.C., Zheng H., Chen H., Becher M.W., Sirinathsinghji D.J., Trumbauer M.E., Chen H.Y., Price D.L., Van der Ploeg L.H., Sisodia S.S. (1997): Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 387: 288-292.

Wysocka J., Swigut T., Milne T.A., Dou Y., Zhang X., Burlingame A.L., Roeder R.G., Brivanlou A.H., Allis C.D. (2005): WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121: 859-872.

Wysocka J., Swigut T., Xiao H, Milne T.A., Kwon S.Y., Landry J., Kauer M., Tackett A.J., Chait B.T., Badenhorst P., Wu C., Allis C.D. (2006): A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* 442: 86-90.

Xiao H., Sandaltzopoulos R., Wang H.M., Hamiche A., Ranallo R., Lee K.M. Fu D., Wu C. (2001): Dual functions of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions. *Mol. Cell.* 8: 531-543.

Yamaguchi M., Ogren L., Endo H., Thordarson G., Bigsby R.M., Talamantes F. (1992): Production of mouse placental lactogen-I and placental lactogen-II by the same giant cell. *Endocrinology* 131: 1595-1602.

Yamaguchi M., Ogren L., Endo H., Soares M.J., Talamantes F. (1994): Co-localization of placental lactogen-I, placental lactogen-II, and proliferin in the mouse placenta at midpregnancy. *Biol. Reprod.* 51: 1188-1192.

Yamamoto H., Flannery M.L., Kupriyanov S., Pearce J., McKercher S.R., Henkel G.W., Maki R.A., Werb Z., Oshima R.G. (1998): Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. *Genes Dev.* 12: 1315-1326.

Yamamoto M., Saijoh Y., Perea-Gomez A., Shawlot W., Behringer R.R., Ang S.L., Hamada H., Meno C. (2004): Nodal antagonists regulate formation of the anteroposterior axis of the mouse embryo. *Nature* 428: 387-392.

Zeng L. und **Zhou M.M.** (2002): Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett.* 513: 124-128.

Zernicka-Goetz M. (2002). Patterning of the embryo: the first spatial decisions in the life of a mouse. *Development* 129: 815-829.

Zhou X., Sasaki H., Lowe L., Hogan B.L.M., Kuehn M.R. (1993): Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* 361: 543-547.

Zhou Y. und **Grummt I.** (2005): The PHD finger/bromodomain of NoRC interacts with acetylated histone H4K16 and is sufficient for rDNA silencing. *Curr. Biol.* 15: 1434-1438.

Zhu P., Bowser R. (1996): Identification and analysis of the complete cDNA sequence for the human FAC1 gene. *Biochem. Biophys. Acta* 1309: 5-8.

Zybina E.V. und **Grishchenko** T.A. (1970): Polyploid cells of the trophoblast in various parts of the placenta of the white rat. *Tsitologiya* 12: 585-595.

Zybina E.V. (1970): Characteristics of polyploidization of trophoblast cells. *Tsitologiya* 12: 1081-1094.

Zybina E.V. und **Zybina** T.G. (1985): Polyteny and endomitosis in supergiant trophoblast cells of the gray vole *Microtus subarvalis*. *Tsitologiya* 27: 402-410.

Zybina E.V. und **Zybina** T.G. (1996): Polytene chromosomes in mammalian cells. *Int. Rev. Cytol.* 165: 53-119.

8 Anhang

8.1 Die murine *Bptf/Fac1*-cDNA-Sequenz

CACCTGGCCCGGACCACCCCGGCCCGCCGCGCGTCAACAAAGTGGTGTACGATGACCACGAGAGTGACGACGACGACG
 AGGAGGAGGACATGGTCTCGAGGAGGACGAGGAGGAGGAGGAGGATGGCGACGCCGAGGAGACCCAGGATTCCGA
 GGACGAGGAGGAAGATGACATGGAAGAAGACGACGATGACTCCGATTATCCGGAGGAGATGGAAGACGACGACGACG
 ACGCTAGTTACTGCACGGAAAGCAGCTTCAGGAGCCATAGTACATACAGCAGCACTCCAGGTAGGCGAAAACCAAGAG
 TACATCGGCCTCGTTCTCCAATATTAGAAGAAAAAGACATCCACCCCTTGAATTTCCGAAGTCCTCTGAGGATTTAATG
 GTGCCTAATGAGCATATAATGAATGTCATTGCCATTTATGAGGTGGTGCGGAACCTTTGGCAACGTTTTAAGGTTGTCCCT
 TTTTGCTTTGAGGACTTCTGTGCGGCTCTGGTGAGCCAAGAGCAGTGCACACTCATGGCGGAGATGCACGTGGCGCTTC
 TGAAAGCAGTTCTTCGAGAAGAGGACACGTCTAACACCACCTTTGGCCCTGCGGACTTGAAAGACAGTGTAACCTCCAC
 CCTGTATTTTCATCGACGGGATGACGTGGCCGGAGGTCTGAGGGTCTACTGTGAGAGTGACAAGGAGTACCACCATGTC
 CTTCTTACCAGGAGGCAGAGGACTATCCCTACGGACCAGTGGAGAACAAAATCAAAGTTCTGCAGTTTCTAGTCGATC
 AGTTCCTTACGACCAATATTGCTCGTGAGGAGCTGATGTCTGAAGGGGTAATCCAGTATGACGACCATTTGAGGGTCTGT
 CACAACTTGGGGATCTGCTGTGCTGTGAGACGTGCTCGGCTGTGTACCATTAGAGTGTGTGAAGCCGCTCTTGAAG
 AAGTGCCGGAGGACGAGTGGCAGTGTGAAGTCTGTGTGGCACACAAGGTGCCTGGTGTGACTGACTGTGTGCTGTAAG
 TCCAAAAGAATAAACCTACGTTTCGACACGAACCTATTGGGTATGACAGAAGCCGTAGGAAATACTGGTTTTAAACCGA
 AGACTCATAATAGAAGAAGACACAGACAATGAAACGAGAAGAAAGTTTGGTACTACAGCACAAAGGTCCAGTTAGCA
 GAGCTAATAGACTGCCTAGACAAAGGATACTGGGAAGCAGAACTGTGCAGAGTTCTAGAAGACATTCCGGGAGGAGATG
 CAGCAGCATATGGATGTAACGGAAGACCTGACCAACAAGGCTCGTGGCAGCAACAAGTCCTTCTAGCGGCAGCTAAT
 GAGGAAATTTGGACTCCTTAAGAATCAAACGAGGGGGAAGATATTGACTGTGATCAGAGCCAGAAAGACCCAGAAAAG
 GACAAGCATGAGGGCGAGAACAACAGCTCCAAGGATGCTGAGAAGAGCAGGGAGGAGGCGGAGGACCCCTCCGCAGA
 CAAGGACGCTGACAGCAAAGGCCTGGAGGAAGAGCCCGGCATGGAAAACCTGAGGAGCCAACAGAAGTTGGGGATA
 AAGGTAACCTGTGCCAGCAAATCTTGGCGACAACACAACAAATGCTTCTCCAGAAGAGACTAGTCCCTGTGACGGGAG
 GAGCCCCGAGGGCTGTCTCTCAGAGACCCATGATAGCAGCAGCATGGCAGAGAAGAAGGTGGCATCTGAGCTCCCCC
 GGATGTACCAGAAAGACTCTAACAGGACATGTGACAGCAGTAACACTAGTGCTACCACTGCCTCCAGCCAGCCTAACCTG
 GAGACCTGCAGCAGCAGCGAGCTCACTTCTCCAGAGTGACTCTGCTAAGGCAGCGGATGACCCTGAGATTGGAGAA
 AGAGACTCCCATACCTGTCTCTGTTACGAAGAGATAGGTGATTTAGACTGGAGAAGTCCAATGGAGAAGTTCCG
 AGTCCCCTGGAGCTGGGAAAGGAACATCTGGGTCCACTCGTATCATACCAGACTGAGGAACCCGGAGAGCAAATCA
 GTCAGCTCAAGAGTCAGCAGGTGGCAGCTGCAGCCATGAAGCAAATAAATTGTTTAAGGAGGGGAAAGAGGTGCTGG
 TGGTTAACTCCCAAGGAGAGGTTTACGGCTGAGCACCAAAAAGGAGGTGGTCATGAAAGGGAACATCAACAATATT
 TAAGCTGGGACAAGAAGGGAAGTATCGAGTCTACCACAATCAATCTCGACCAATTCATTGCTCTGAATAAACACCAG
 CACAGAGAAGACCATGATAAGAGGAGGCATCTTGACATAAATTCTGTCTCACTCCAGCTGGGGAGTTCAAATGGAACG
 GGTCTGTTACGGGTCCAAAGTCCTTACCATCTCAACCTGAGACTACCATCACACAGCTAGAGAGCAACATTCCTTCA
 TCCTTCTTACCCCAATGGGCTTACACAGGGCTAATTGGATCAAGGCCGTTGAGATGTGTAGTAAACCCAGAGAGTT
 TGCGTTGGCTCTCGCAATTCTGGAGTGTGCAGTTAAGCCAGTTGTGATGCTGCCAATATGGCGGGAGTCTCTAGGACATA
 CCCGTTACATAGGATGACATCAATTGAAAGGGAAGAAAAAGAGAAAGTTAAAAAAAGGAGAAAAACAAGAGGAGG
 AGGAGACAATGCAGCAGGCCACATGGGTAAAATACACATTTCCAGTGAAGCACCAGGTTTGGAAACAGAAAGGTGAGG
 AGTACCGAGTGACAGGGTACGGCGGCTGGAGCTGGATTAGCAAGACGCACGTTTACAGATTTCTCCCAAGTTACCAGG
 AAACACGAATGTAACACTACAGAAAGCCCTTGATGGAGCCAAAAACAATACAGATGAAAATAAAGATGAGTCAGAGAA
 AAGGAAAAGTCCACGAAGTCCAAAAAAATGAAGACAGAATGTGATTCTGAACAAGGTGAGACCAGAGATGCAGATGC
 CACAGCTGGAGCCGCCGAGGGGCAATGGAGCTGTCTAAGGAACCTGAGAAGAAGGATCAAGATGTAAAGAAGCTTTT
 AGATTCTGATAATGACAAATCCTTCAAGGAAGAACCAATGGAGATCGATGATACCATAAAAAACAGAGTCACACGTGAGC
 AGTCTGAAAGCACAGAGGTAGATGTAGTCAATGTTAGTGAGGGCTTCCATCTAAGGACTAGTTACAAAAAGAAAACGA
 AATCCTCTAAGCTGGACGGGCTTCTGGAACGGAGGATTCGACAATTTACACTGGAAGAAAAACAGCGTCTTGAGAAGTT
 AAAGCTGGAGAGTGGGGTGAAGGGGGCGGGGAAGCCCCCATGGGTGCTCTGAAAAGCTCCTCTGAGTCTCCAGGCTC
 CACAAAAGCAAGCGAAGGGCATCAGGGTGACTCGCTGAGACAGGAACAAAGCCCCAGTTCAGTCAAGGCTAGCACTGT

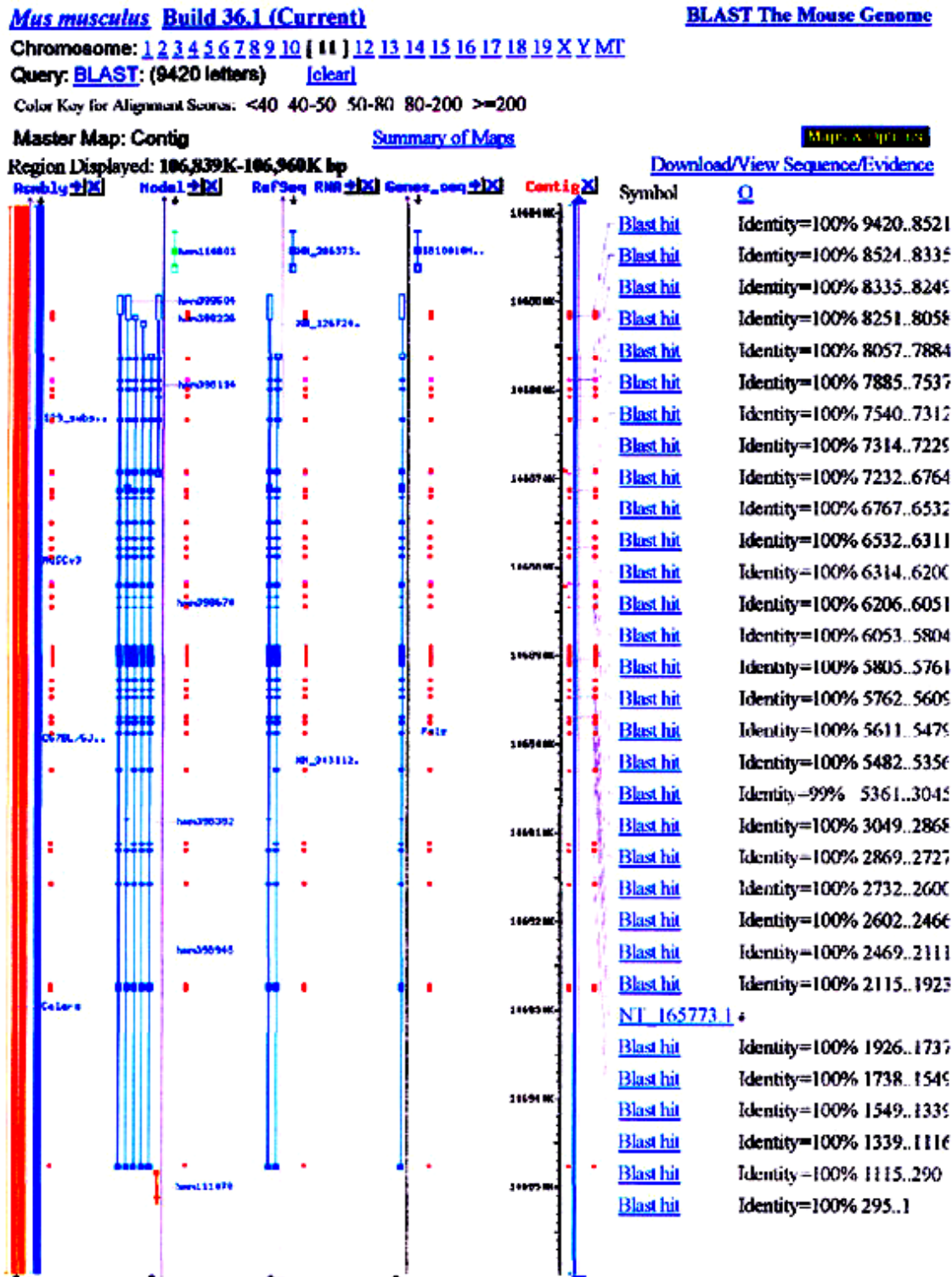
GGACTTGGGGCTGGGGGGCTCACAAAGTGATCCCTTGGTTCTTGGCATCAGTCCTCCTAGTCTAAGCACGCACAAACCT
GATCCAAAAGATCAAGTATTAGATGATGTCTCCATTAGAGTCCAGGGCCAACTGTGAGAGGCCAACTCAGTTGAAA
GCGACCTAGATGCCAGGATCTCTGAACCTGCCGGTAAGGGACTGGAACAAAGTCAGACTAAAACAGAAGTGACTGACTC
TTCCTCTGATGACTCTAAACCAACAGTGCAGACGATGTTGGCATTTTGATCTGTAAGAGCAGAAAAGCTGCACTCACAGG
ACGATAGCAGCACCGTTGTGTCTTCTTCCAAGAGTACTTTACCTGCATCAGTACCTAAAAGTCCCCGTGACAGAGATGCC
CGGGCCTTCTCAAAAGCAGTGGACTTCGATGGGAGACTAGGTGGTGACTCTGAATATAGTAGCACTTTGGAAAATAGCT
CTGATAATATGTGTATTCCGGGACAGTGCTGAAGAAGATATGGTTGTTGAGAAGCAGCAGTGAAGCCACCTCGAAACGGTT
CATAGCTCCAGAACAAAGGAGGAGAAAGCGTGAGTGCACAAAATGTCAGGTAGTTTCTAAGTCCACTGAAAACCTGTGAA
GACAACTACAGGGTAAGGTAAGTGAAGCAAACGGTAAGAACTGGGCCAACATCCTCAAAGCCAGAGGAGAGAGCA
GTTAACAGATGTAAGTACCAAGTCAGCCTGCGACACAGCGTTGACAGAAAGAACAGTGAACCTCGAGAGTCTGAAAAG
AAAGGACAGAAAGCAAATAAATTTCAAATAAACCGGCAAGATAGCAAAGCTAAGGGGTACCTGAAGGGGCCGGGCACG
AAGGACGGCTCTGATGGTAAAGTTGTGAGTAGTGCTGTAGAACCAAAGGTCAATAATATCAATAAAGTCATCCCTGGGA
ATACCAAGTCACTGGCTGGGAAGGAATCTGCTGCCAAGCCGTTCAACGGTGACATCATTATGGAAGAGTTGAGTGA
ACAAAACACTTCAGAAACCAACTCATACTCACTGAGTTCTTCAGATGCCAAAGGTAATACCAAGATGGCCTCCATACCC
TACCATCCACCAAAGAGTCTGCCAGTACCCAGGTAATCACACCCCGAGCCCTTGTCCAGATCGGAACTCACTTAGTCA
GGTAGAAGATATGAAAACCTGAAAGTCCAGAGGTTAAGAGAGTTATCCCGTCTCCTGTTAGAACTGGAGAGGGCTTAAC
CTTAGCAAGGGCTTCATGGATGACAATGGACTGCCTTCAGCAAAGACGAGAAGCTCAATGGAGAATCCCAAAGAAAG
ACGGTCATCACAGAAGTCACCACAATGACATCTACTGTTGCCACAGAATCAAAAACCTGTCATTAAGGTAGCAAAAGGAG
ACAAGCAAACCTGTGGTTTCTTCCACAGAAAATTGTGCCAGATCCACAGTCACAACCTACCACTACCACTGTGACAAAGCTC
TCCACACCCCTCCCCAGACACCGGTGTGGATACCATCTCTGTAAAGGAGCAGAGTAAAACCGTGGTCACCACGACAGTGA
CGGACTCCTTGACCACTGCAGGAAGCACACTGGTGACATCTATGACCGTGAGCAAAGAGTACTCCACGAGAGACAGGG
TAAAGCTGATGAAGTTCTCAGCACCCAAGAAGACCCGCTCAGGCACTGCCCTGCCGTCTATAGGAAGTTCTGTACCAA
GAGCAGCAAAAAGAGCATATTTGTGTTACCTAATGATGACTTGAAAAAGCTGGCCAGGAAAGGAGGGATCCGGGAGGT
CCCTTACTTTAATTATAACGCGAAACCTGCCTTGATATATGGCCATACCCTTCTCCTAGACCGACCTTTGGTATCATG
GAGGTATAGACTACAGACGGTAAAGTCCTTGGCTGGAGTGAGCCTGATGTTACGGTTGCTGTGGGCCAGTTGAGATGG
GATGACATGGCAGCCAAGGCTCCTCCAGGAGGAGGGTCTACACGGACAGAAACATCTGAAACTGAAATCACAACCACT
GAGATAATTAAGAGGCGTGATGTGGGCCCTTATGGCATTGCTTCTGAGTATTGTATCAGGAAGATCATTGCCCCATTGG
AGTTCCAGAAGCACCAAAAGAAACACCCACACCTCAGCGGAAGGGCCTCCGATCAAGTGCACTTCGGCCAAAGAGACC
AGAGACCCCAAGCAGACGGGCCCTGTTATCATTGAGAGCTGGGTAGCAGAAGAAGAGCTGGAGCTCTGGGAGATCAG
GGCTTTTGCTGAGAGAGTGAGAGAAAGAAAGGCTCAAGCAGCAGAGCAGCAGACCAAGAAACGTTTGGAGCAGCAGAA
GCCTGCAGTCATCGCAGCGTCCACCACGTCCCCAGCAAACACAAGCAGCACTGTCTCTCAGCCAGAAAGGTGAT
GGTGGCTCCCTTAAGTGGCTCGGTACCCCTGGAACAAAGATGGTGCTGGCCACAAAAGTCGGCTCGCTGCCACAGTC
ACATTCCAGCAAAACAAGAACTTCCATCAAACCTTTTGCCACGTGGGTGAAGCAAGGCCAGTCCAATTACGGCATGGTCC
AGGTACAGCAGAAGGTCTGGGGATCATTCCATCGACTACAGGTCCAAGCCAGCAAACCTTACTTCAATCCAGCCAG
GACTGCAACTGTACAAATTAGGCCAATACCTCAGCCTCTGCAGGAACCACTACCACATCACAGGTGATCACAGGGCCT
CAGATCCGCCCTGGCATGACAGTGATTAGAAGCCACTCCAGCAGCCAGCACTGGGAAAGGCGATCATTGCAACACCA
GTGGTGGTGCAGCCAGGCACACCCCAACAAGTTGTGACTCAAATCATCCGAGGACAGCCTGTTTCCACTGCCATCTCTG
CTCCAAGTACAGCTTCTCAGCACCTGTACAAAAGGGCTTAACCTCAGGAGCAGCGGCTGGGCCCTCTGCAGCCTTCAGC
CCCACACAGCCCTCGTCTCAGCAAGGGCAGGTGAAGCTCACCATGGCTCAGCTCACTCAGCTCACGCAGGGCCATGG
CGGCAACCAAGGTTTAACAGTAGTGATTCAAGGACAAGGGCAGACTACTGGACAGTTGCAGTTGATACCTCAGGGGATG
ACAGTCTTCCAGGGCCAGGGCAGCAGCTCATGCAAGCTGCAATGCCGAATGGCACCGTTCAGCGTTTCTCTTTACCC
CACTATCAACATCAGCCACGGCCGCCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCACCCTACTAATGCTACAGCAGCAGGCT
CAGGGGAACAAAAACAGAGTAAATATTACCCAGACCCAGGTACAACCAGCCACAACCTGGCACCAACTCAGTCAT
CAAGTGTGAGTCTCGAGAAGCCAGCCACAGCCTGCTCAGCCTGCAGCACAACCCAGCCCCAGCCCCAGCCCCAG
CTCAGCCTGAAGTCCAGACCCAGCCAGCTGTCTCGTCCATGTCCCTTCTGAAACACAGCCCTCCCAAGCACAGACATC
TAAACCCCTGGTTGCAACACAGTGTGAGCCTCAGAGCAGTGTAAGGACAGTCTCCTGTTGAGTCCAGAGTCCACCA
CTGACTCGAATACGTCCATCAACTCCATCCCAAGTGACTCCTGGACAGCAACCCAGGTTTCACTACAGCTTCACAGC
CGATTCCAATTCGCCCCCCACATCTCTGCAGGCACCTTCCCAAGGCCAGCCACAGTCACAGCCCCAGGTGGTGATGAA
GCATAATGCTGTAATAGAACATTTAAACAGAAAAAGACCATGACTCCAGCTGAAAGAGAAGAAAAATCAAAGGATGATT
GTCTGTAACCAAGGTGATGAAGTATATTCTGGATAAGATAGATAAAGAAGAAAAACAGGCGGCCAAGAAACGCAAGCGG
GAGGAGAGTGTGGAGCAGAAGCGGAGCAAACAGAATGCCAGCAAGCTCTCTGCTGCTGTTCAAACACAAGGAGCAG
CTCAAAGCTGAGATCCTGAGAAAGAGAGCGCTCCTGGACAAAGAGTTGCAGATCCAAGTGACAGGAAGAGCTGAAAAGA

GACCTGAAAATGAAACGAGAGAGGGAGATGGCCCAGGCGGTACAGGCCAATGCTGCCTCAGTGCCACACCCCTCCGTG
CCAGCCCCTGTGCCAGCGCCTGCACCGGCAGCCCCTCCAGCTCCTCCTCGTTCTCCGCCTCCCTCCACACACAGTCTGC
CACCTGCAGGCCACCCACAGCCCCACTGCCTGTCACTTCCCAGAAGAGGAAGCGGGAGGAAGAGAAGGACTCTAAGT
CCAAGAAGAAGAAGATGATCTCTACCACCTCTAAGGAGGCCAAGAAGGACACCAGGCTATATTGCATCTGCAAGACACC
GTACGATGAGTCCAAGTTCTATATTGGCTGTGATCTTTGTAATACTGGTATCATGGAGAATGTGTTGGCATCACAGAAA
AGGAGGCTAAGAAAATGGATGTGTACATCTGTAATGATTGTAAGCGGGCACAAGAGGGCAGCAGTGAGGAATTGTA
TATCTGCAGGACACCTTATGATGAGTCACAATTTTATATTGGCTGTGATCGGTGTCAGAATTGGTACCACGGGCGCTGTG
TTGGCATCTTGCAAAGTGAGGCAGATCTCATTGATGAGTATGTCTGTCCACAGTGCCAGTCGACAGAGGACGCCATGAC
AGTGCTCACA**CCACTGACAGAGAAAGATTATGAGGGCTTGAAGAGGGTGCTGCGCTCCTTACAGGCCACAAGATGGC**
GTGGCCTTTCTTGAACCGGTAGACCCCAATGATGCACCGGATTATTACGGTGTTATTAAGAGCCAATGGACCTTGCCA
CCATGGAAGAAAGAATACAAAAACGGTATTATGAAAAGCTGACAGAGTTCTGTCAGATATGACCAAAATTTTGTATAA
CTGCCGTTATTACAATCCCCGTGACACCCCTTTTACCAGTGTGCAGAAGTTCTTGAATCATTCTTTGTACAGAACTAAA
AGGATTCAAGGCCAGCAGGTCTCATAACAACAAGCTGCAATCTACAGCTCCTTAG**AACTCAGCGTGTCTGTACCTAAGC**
 TAGACACAGCAAGTCTGGCGCTCTGAACTATTTAACTAAAGCGCCAGATATTTTCAGTCAGGCTTTCTTGACAAGACCGTA
 ACCTCGTTCATATTGGTCACAACAGTCCAGTTGTATTCTTGGCCAATTTTGTCCAACGGACAAAGGAAAAGCAAAGTCAACG
 GCACCGTTGTCTTGTGAGAGCAAATGGCTTTACTATTGTGGCAGAAGCAGGAACTTTGTTTATTGGAAAAAAAAAAAAA
 AAAAGAAAAGCAAGAAAAAAAAAAAAAGATACTATGGGGTCAAGTGTAACTCCGTGGGATGCCACATCTGCTCTTCAGTGA
 AGAAGCTGTTTAGAGTCTCAGAAAACTTTTGACTGTATTTATTATTGTTGCAAAAAAAGACGCTTTTTTATTGCTGCCCTC
 ATTTGTCAGCTAATTATTTTTCTTATACAAATCCAGCCCTGGTTCGTGTATCCACCCTGTATCCTATCATGATTCCTGTAGG
 TGAAGTACAAGGCGACCTCTAGGTGTCTTTTCTTTCTATGAAAGGAGCTGCTATGTACACATGTGCACACACAACCTGGGAAT
 CAACAATGAGTTTATTGTTACGGGAGACACAAGTGAAGCTTGCAGAAAGGTTGGGCTAAGTGGTCCTGGACTAACAGACT
 TCGTTGCCTTGAATACACCAGTACAAATTGTCAATTTACTCTGCACCAGGCTAAATGAGCAAAATCTATTTGAAGGTATCTTGT
 TTGTAACATTGTGAGATTCTAATTTTTTCTTTTGTATTAATAATTCACTATGGATGTATACGAATCGA**AATAAA**TGGAGATC
 ATTTTCTC

Farbkode: 5'- und 3'-untranslatierte Region, **kodierende Sequenz**, **für funktionelle Proteindomänen**
kodierende Sequenzabschnitte, in der Reihenfolge ungerade Exons, in der Reihenfolge gerade
 Exons, **Polyadenylierungssignal**

8.2 Der *Bptf/Fac1*-Locus im Mausgenom auf Chromosom 11

Anhand der 9420 bp langen *Bptf/Fac1*-cDNA-Sequenz wurde in der NCBI-Mausgenom-Datenbank der *Bptf/Fac1*-Locus gesucht; unter **contig** sind die 31 Exons als rote Balken abgebildet; die rechte Spalte gibt die Übereinstimmung der Exonsequenzen mit der genomischen Sequenz an; im linken Bereich sind als blaue Linien mehrere cDNA-Sequenzen (theoretisch oder experimentell erbracht) aufgeführt, die allesamt der kompletten *Bptf/Fac1*-Varianten entsprechen



8.3 Die murine Bptf/Fac1-Aminosäuresequenz

MVS	EEEEEEED	GDAEETQDSEDEEEDDMEEDDDDDSDYPEEMEDDDDDASYCTESSFRSHSTYSSTPGR	RKPRVH	75
RPR	SPILEEKDIPPLEFPKSS	EDLMVP	NEHIMNVIAIYEVVRNFGNVLRLSPFCFEDFCAALVSQEQCTLMAEMH	150
VALLKAVLREED	TSNTTFGPADLKDSVNSTLYFIDGMTWPEVLRVYCESDKEYHHVLPYQEAEDYPYGPVENKIK			225
VLQFLVDQFLTTNIAREELMSEGV	IQY	DDHCRVCHKLGDLLCCETCSAVYHLECVKPPLEEVPEDEWQCEVCVAH		300
KVPGVTDCVAEVQKNKPYVRHEPIGYDRSRRKYWFLNRRLIEEDTDNENEKKVWYYSTKVQLAELIDCLDKGYW				375
EAELCRVLEDIREEMQQHMDVTEDLTNKARGSNKSFLAAANEEILDSLRIKRGEDIDCDQSPEDPEKDKHEGENN				450
SSKDAKSREEAEDPSADKDADSKGLEEEPGHGKPEEPTVEVDGKNSVPANLGDNTTNASPEETSPCDGRSPEGC				525
LSETHDSSSMAEKKVASELPPDVPEDSNRTCDSSNTSATTASSQPNLETCSSSELTSSQSDSAKAADDPEIGERD				600
SHTPVSVHIEIGDFRLEKSNGEVSESPGAGKGTSGSTRIITRLRNPESKLSQLKSQQVAAAHEANKLFKEGKEV				675
LVVNSQGEVSRSLTKKEVVMKGNINNYFKLGQEGKYRVYHNQ	YSTNSFALNKHQHREDHDKRRHL	AHKFCLTPAG		750
EFKWNGSVHGSKV	LITISLRLTITQLESNIPSSFLHPN	WASHRANWIKAVQMCSKPREFALALAILECAVKPVVM		825
LPIWRESLGHTRLHRMTSIEREEKEKVKKKKEKKQEEETMQQATWVKYTFPVKHQVWKQKGEEYRVTYGGWSWI				900
SKTHVYRFLPKPLPGNTNVNRYRKPLDGAKNNTDENKDESEKRKSPRSPKMKTECDSEQGETRADATAGAAAGAM				975
ELSKEPEKKDQDVKELLDSDNDKSFKEEPMIEDDTIKTESHVSSLESTEVDVNVVSEGFHLRTSYKKKTKSSKLD				1050
GLLERRIRQFTLEEKQRLEKLKLESGVKGAGKPPMGALKSSSESPGSTKASEGHQGDSLRQEQSPSSSQASTVDL				1125
GLGGSQSDPLVLGISPPSLSTHKPDPKDQVLDDVSIQSPGPNCQRQNSVESDLARISEPAGKGLELSQTKTEVT				1200
DSSSDDSKPTSADDVGILICKSRKLHSQDDSSSTVSSSKSTLPASVPKSPRDRDARAFSKAVDFDGRLLGGDSEYS				1275
STLENSSDNMCIRDSAEEDMVVQNSSEATSKRFIAPEQGGESVESTKCQVVSSTENCEDKLQGVTEANGKKLG				1350
QHPPKPEERAVNRCTDQVSLRHSVDRKNSEPRESEKKGQKANKFQINGKDSKAKGYLKGPGTKDGSQDKGVSSAV				1425
EPKVNINNKVIPGNTKSLAGKESAAPFINGDIIMEELSEQNTSETNSYLSSSDAKGNHQDGLHTLPSTKESAS				1500
TQVITPRAPCPDRNSLSQVEDMETESPEVKRVIPSPVRTGEGSNLSKGFMDNGLPSSKDENVNGESQRKTIVITE				1575
VTTMTSTVATESKTVIKVAKGDKQTVVSSSTENCARSTVTTTTTITVTKLSTPSPDTGVDTISVKEQSKTVTTTTVT				1650
DSLTTAGSTLVTSMVTKEYSTRDRVKLMKFSRPKTRSGTALPSYRKFTVTKSSKKSIFVLPNDLKLARKGGI				1725
REVPYFNYNAKPALDIWYPSPRPTFGITWRYRLQTVKSLAGVSLMLRLLWASLRWDDMAAKAPPGGGSTRTETS				1800
ETEITTEIIRRDVGYPYIRSEYCIKIIPIGVPEAPKETPTPQRKGLRSSALRPKRPETPKQTGPVIESWV				1875
AEELELWEIRAFARVEKEKAQAAEQQTKKRLEQQKPAVIAASTSPANNTSSTVSPAQKVMVAPLSGVSPTGT				1950
KMVLATKVGSPATVTFQQKNFHFQTFATWVKQGGQNSGMVQVQKVLGIIPSTTGPSQQTFTSFQPRATATVIRP				2025
NTSASAGTTTTTSQVITGPQIRPGMTVIRTPQLQPALGKAIIRTPVVVQPGTPQQQVVTQIIRGQPVSTAISAPSTA				2100
SSAPVQKGLTPGAAAGPLQPSAPHSPRPQQGQVKLTMAQLTQLTQGHGGNQLTVVIQGGQQTGQLQLIPQGMT				2175
VLPGPQQQLMQAAMPNGTVQRFLFTPLSTSATAASSSSNSSSTTTNATAAGSGEQKQSKILPQTQVQPATTLAPT				2250
QSSSVSPAQAQPPAQAQAQPPAQAQPEVQTQPAVSSHVPSETQPSQAQTSKPLVATQCQPPQSSVQGGQSPV				2325
RVQSPPLTRIRPSTPSQVTPGQQPQVQTASQPIPPPTSLQAPSQQGPQSQPVVMKHNAVIEHLKQKKTMTPT				2400
AEREENQRMIVCNQVMKYILDKIDKEEKQAARKRKREESVEQKRSKQNASKLSALLFKHKEQLKAEILRKRALLD				2475
KELQIQVQEELKRDLMKREREMAAVQANAASVPTSPVPAPVPAPAPAAPPRSPPPSTHSLPPAGHPTAPL				2550
PVTSQKRKREEEKDSKSKKKKMISTTSKEAKKDTRL	YCICKTPYDESKFYIGCDLCTNWWYHGECVGEKEAKKM			2625
DVYICNDCK	RAQEGSSEEL	YCICRTPYDESQFYIGCDRCQNWYHGRCVGILQSEADLIDEYVCPQCQ	STEDAMTV	2700
LT	PLTEKDYEGLKRVLRSLQAHKMAWPFLPVPNDAPDYGVKEPMDLATMEERIQKRYYEKLTEFVADMTKI			2775
FDNCRYYNPRDTPFYQCAEVLESFFVQKLK	GFKASRSHNNKLQSTAP.			2823

Funktionelle Proteindomänen: saure Domäne, basische Domäne, DDT, PHD, Bromodomäne, NLS, NES

8.4 Vergleich der Aminosäuresequenzen der funktionellen Domänen der Bptf/Fac1-Proteine von Maus, Ratte, Mensch und Fruchtfliege

Basische Domäne

RRKPRVHRPR	Consensus-Sequenz
RRKPRVHRPR	<i>Mus musculus</i>
RRKPRVHRPR	<i>Rattus norvegicus</i> XP_221050
RRKPRVHRPR	<i>Homo sapiens</i> BAA89208
GRKPRVHSPE	<i>Drosophila melanogaster</i> AF41792

DDT

NEHIMNVIAIYEVVRNFGNVLRLSPFRFEDFCAALVSQEQ	Consensus-Sequenz
NEHIMNVIAIYEVVRNFGNVLRLSPFCFEDFCAALVSQEQ	<i>Mus musculus</i>
NEHIMNVIAIYEVVRNFGNVLRLSPFCFEDFCAALVSQEQ	<i>Rattus norvegicus</i> XP_221050
NEHIMNVIAIYEVLRNFGTVLRLSPFRFEDFCAALVSQEQ	<i>Homo sapiens</i> BAA89208
NTHVLNALAIYEVVRNFGNVVRLSPFRFEDLCAALASEEQ	<i>Drosophila melanogaster</i> AF41792

CTLMAEMHVALLKAVLREED	Consensus-Sequenz
CTLMAEMHVALLKAVLREED	<i>Mus musculus</i>
CTLMAEMHVALLKAVLREED	<i>Rattus norvegicus</i> XP_221050
CTLMAEMHVLLKAVLREED	<i>Homo sapiens</i> BAA89208
SALLAEVHVALLKAVLREED	<i>Drosophila melanogaster</i> AF41792

N-terminaler PHD

DDHCRVCHKLGDLLCCETCSAVYHLECVKPPLEEVPEDEW	Consensus-Sequenz
DDHCRVCHKLGDLLCCETCSAVYHLECVKPPLEEVPEDEW	<i>Mus musculus</i>
DDHCRVCHKLGDLLCCETCSAVYHLECVKPPLEEVPEDEW	<i>Rattus norvegicus</i> XP_221050
DDHCRVCHKLGDLLCCETCSAVYHLECVKPPLEEVPEDEW	<i>Homo sapiens</i> BAA89208
DDHCRVCHRLGDLLCCETCPAVYHLECVDPPMNDVPTEDW	<i>Drosophila melanogaster</i> AF41792

QCEVCVAH	Consensus-Sequenz
QCEVCVAH	<i>Mus musculus</i>
QCEVCVAH	<i>Rattus norvegicus</i> XP_221050
QCEVCVAH	<i>Homo sapiens</i> BAA89208
QCGLCRSH	<i>Drosophila melanogaster</i> AF41792

NLS

YSTNSFALNKHQHREDHDKRRHL	Consensus-Sequenz
YSTNSFALNKHQHREDHDKRRHL	<i>Mus musculus</i>
YSTNSFALNKHQHREDHDKRRHL	<i>Rattus norvegicus</i> XP_221050
YSTNSFALNKHQHREDHDKRRHL	<i>Homo sapiens</i> BAA89208
YSTNPIALNKPQRNEERDKRRHL	<i>Drosophila melanogaster</i> AF41792

NES

LTISTLRLTITQLESNIPSSFLHPN	Consensus-Sequenz
LTISTLRLTITQLESNIPSSFLHPN	<i>Mus musculus</i>
LTISTLRLTITQLESNIPSSFLHPN	<i>Rattus norvegicus</i> XP_221050
LTISTLRLTITQLENIPSSFLHPN	<i>Homo sapiens</i> BAA89208
NMITTLRQT LINFESNIAASFLNIN	<i>Drosophila melanogaster</i> AF41792

1. C-terminaler PHD

YCICKTPYDESKFYIGCDLCTNWWYHGDCVGITEKEAKKMD	Consensus-Sequenz
YCICKTPYDESKFYIGCDLCTNWWYHGE CVGITEKEAKKMD	<i>Mus musculus</i>
YCICKTPYDESKFYIGCDLCTNWWYHGDCVGITEKEAKKMD	<i>Rattus norvegicus</i> XP_221050
-----	<i>Homo sapiens</i> BAA89208
YCICRTPYD DTKFYVGCDLCSNW FHGDCV SITEEASKKLS	<i>Drosophila melanogaster</i> AF41792

VYICNDCK	Consensus-Sequenz
VYICNDCK	<i>Mus musculus</i>
VYICNDCK	<i>Rattus norvegicus</i> XP_221050
-----	<i>Homo sapiens</i> BAA89208
E F I C I D C K	<i>Drosophila melanogaster</i> AF41792

2. C-terminaler PHD

YCICRTPYDESQFYIGCDRCQNW F HGRCVGILQSEAE LID	Consensus-Sequenz
YCICRTPYDESQFYIGCDRCQNWYHGRCVGILQSEAD LID	<i>Mus musculus</i>
YCICRTPYDESQFYIGCDRCQNW F HGRCVGILQSEAE LID	<i>Rattus norvegicus</i> XP_221050
YCICRTPYDESQFYIGCDRCQNWYHGRCVGILQSEAE LID	<i>Homo sapiens</i> BAA89208
YCS CRQPYDESQFYICCDK CQDW F HGRCVGILQSEAE FID	<i>Drosophila melanogaster</i> AF41792

EYVCPQCQ	Consensus-Sequenz
EYVCPQCQ	<i>Mus musculus</i>
EYVCPQCQ	<i>Rattus norvegicus</i> XP_221050
EYVCPQCQ	<i>Homo sapiens</i> BAA89208
EYVCP ECQ	<i>Drosophila melanogaster</i> AF41792

Bromodomäne

PLTEKDYEGLKRVLRSLQAHKMAWPFLEPVD PNDAPDYYG	Consensus-Sequenz
PLTEKDYEGLKRVLRSLQAHKMAWPFLEPVD PNDAPDYYG	<i>Mus musculus</i>
PLTEKDYEGLKRVLRSLQAHKMAWPFLEPVD PNDAPDYYG	<i>Rattus norvegicus</i> XP_221050
PLTEKDYEGLKRVLRSLQAHKMAWPFLEPVD PNDAPDYYG	<i>Homo sapiens</i> BAA89208
KLT S N D V E G L K N V L K S L Q A H K S A W P F L E P V D P N D A P D Y Y G	<i>Drosophila melanogaster</i> AF41792

VIKEPMDLATMEERI QKRYYEKLTEFVADMTKIFDNC RYY	Consensus-Sequenz
VIKEPMDLATMEERI QKRYYEKLTEFVADMTKIFDNC RYY	<i>Mus musculus</i>
VIKEPMDLATMEERI QKRYYEKLTEFVADMTKIFDNC RYY	<i>Rattus norvegicus</i> XP_221050
VIKEPMDLATMEER VQ RRYYEKLTEFVADMTKIFDNC RYY	<i>Homo sapiens</i> BAA89208
VIKEPMDLATME I K L E S N T Y T K L S E F V G D M T K I F D N C R Y Y	<i>Drosophila melanogaster</i> AF41792

NPSDSPFYQCAEVLESFFVQKLK	Consensus-Sequenz
NP RDT PFYQCAEVLESFFVQKLK	<i>Mus musculus</i>
NPSDSPFYQCAEVLESFFVQKLK	<i>Rattus norvegicus</i> XP_221050
NPSDSPFYQCAEVLESFFVQKLK	<i>Homo sapiens</i> BAA89208
NP KDS SFYQCAE A LESFFVQKLK	<i>Drosophila melanogaster</i> AF41792

Farbkode: **Consensus-Sequenz**, von der Consensus-Sequenz abweichende Aminosäuren

8.5 Ergebnisse der Sequenzierung des 5'RACE-Produktes aus dem ES-Zellklon A012C04

A

A012C04-07065

TGGAGTGCTG	CTGTATGTAC	TATGGCTCCT	GAAGCTGCTT	TCCGTGCAGT	50
AACTAGCGTC	GTCGTCGTCG	TCTTCCATCT	CCTCCGGATA	ATCGGAGTCA	100
TCGTCGTCTT	CTTCCATGTC	ATCTTCCTCT	CCGCGCTCGG	AAATCACGGT	150
TTCTCTTGCC	GACGACGCC	TCTGTGGGGG	GGGGC		185

A012C04-07245

CTGGAGTGCT	GCTGTATGTA	CTATGGCTCC	TGAAGCTGCT	TTCCGTGCAG	50
TAAC TAGCGT	CGTCGTCGTC	GTCTTCCATC	TCCTCCGGAT	AATCGGAGTC	100
ATCGTCGTCT	TCTTCCATGT	CATCTTCCTC	CTCGTCCTCG	GAATCCTGGG	150
TCTCCTCGGC	GTCGCCATCC	TCCTCCTGCT	CCTC		184

A012C04-07477

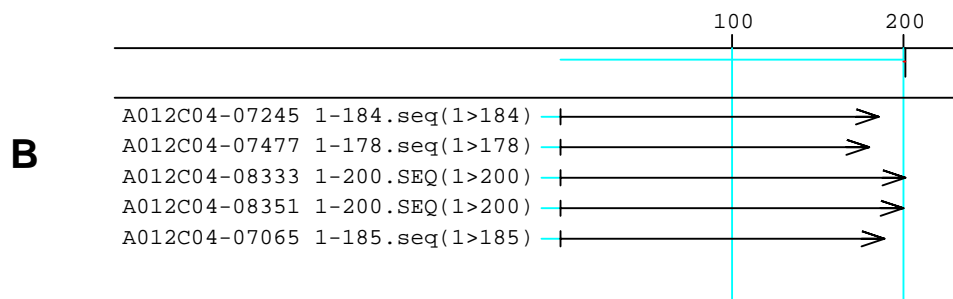
CTGGAGTGCT	GCTGTATGTA	CTATGGCTCC	TGAAGCTGCT	TTCCGTGCAG	50
TAAC TAGCGT	CGTCGTCGTC	GTCTTCCATC	TCCTCCGGAT	AATCGGAGTC	100
ATCGNCGNCT	TCTTCCATGT	CATCTTCCTC	CTCGTCCTCG	GAATCCTGGG	150
TCTCCTCGGC	GTCGCCATCC	TCCTCCGC			178

A012C04-08333

CTGGAGTGCT	GCTGTATGTA	CTATGGCTCC	TGAAGCTGCT	TTCCGTGCAG	50
TAAC TAGCGT	CGTCGTCGTC	GTCTTCCATC	TCCTCCGGAT	AATCGGAGTC	100
ATCGTCGTCT	TCTTCCATGT	CATCTTCCTC	CTGGTGCTCG	GAATCCTGGG	150
TCTCCTCCCC	GTCGCCATCC	TNCTGGTGCT	GGGGGGCTTT	TTTGTGACCT	200

A012C04-08351

CTGGAGTGCT	GCTGTATGTA	CTATGACCTC	TGACCCCCCT	CCCCGCGCAG	50
TAAC TAGCGT	CGTCGTCGTC	GTCTTCCATC	TCCTCCGGAT	AATCGGAGTC	100
ATCGTCGTCT	TCTTCCATGT	CATCTTCCTC	CTCGTCCTCG	GAATCCTGGG	150
TCTCCTCGGC	GTCGCCATCC	TCCTCCTCCT	CCTCGTCCTC	CTCCGAGACC	200

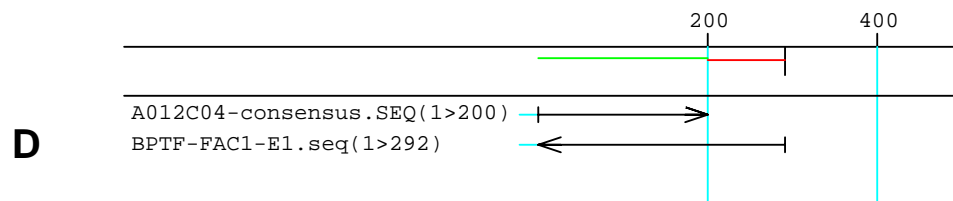


C

Construction parameters:

Match Size	12
Maximum Added Gap Length in Contig	70
Maximum Added Gap Length in Sequence	70
Minimum Match Percentage	80
Maximum Register Shift Difference	70
Lastgroup Considered	2
Gap Penalty	0.00
Gap Length Penalty	0.70
Consensus Threshold	75

Entering 5 sequence on
12.09.2006, 17:07
CREATING NEW contig 1: from A012C04-07245 1-184.seq(1>184)
ENTERING A012C04-07477 1-178.seq(1>178) in contig 1: percent match 98
ENTERING A012C04-08333 1-200.SEQ(1>200) in contig 1: percent match 94
ENTERING A012C04-07065 1-185.seq(1>185) in contig 1: percent match 87
ENTERING A012C04-08351 1-200.SEQ(1>200) in contig 1: percent match 87
Elapsed Time 0:0:0



E

Construction parameters:

Match Size	12
Maximum Added Gap Length in Contig	70
Maximum Added Gap Length in Sequence	70
Minimum Match Percentage	80
Maximum Register Shift Difference	70
Lastgroup Considered	2
Gap Penalty	0.00
Gap Length Penalty	0.70
Consensus Threshold	75

Entering 2 sequence on
12.09.2006, 17:26
CREATING NEW contig 1: from A012C04-consensus.SEQ(1>200)
ENTERING BPTF-FAC1-E1.seq(1>292) in contig 1: percent match 92
Elapsed Time 0:0:0

A Sequenzierungsergebnisse des 5'RACE-Produktes, **B** graphischer Vergleich von fünf Sequenzierungsergebnissen des 5'RACE-Produktes durch das Programm Seq Man II, **C** zur Darstellung von B zugrunde liegende Parameter und Sequenzübereinstimmungen, **D** Vergleich der Consensussequenz mit der Sequenz von *Bptf/Fac1*-Exon1, **E** zur Darstellung von D zugrunde liegende Parameter und Sequenzübereinstimmung

9 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
BLAST	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
BPB	Bromphenolblau
Bptf	<u>B</u> romodomain <u>p</u> lant homeodomain <u>t</u> ranscription <u>f</u> actor
BSA	Rinderserum-Albumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	copy-DNA
cpm	counts per minute
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAB	3',3'-Diaminobenzidin
DDT	<u>D</u> NA-binding and <u>d</u> etermination of <u>t</u> ranscription
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
dH ₂ O	destiliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribonucleotidtriphosphate
DOC	Natriumdesoxycholat
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetat
en-1	Engrailed
engl.	englisch
EPC	ektoplazentaler Kegel
EST	<u>E</u> xpressed <u>S</u> equences <u>T</u> ag
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
<i>et al.</i>	und weitere
Fac1	<u>F</u> etal <u>A</u> lZ50-reactive <u>c</u> lone <u>1</u>
FBE	<u>F</u> AC1- <u>b</u> inding <u>e</u> lement
g	Gramm

HET	heterozygot
ICM	Innere Zellmasse
incl.	inclusive
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LacZ	β -Galaktosidase(-cDNA) (LacZ-Genprodukt)
LAP	<u>L</u> eukemia- <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein
M	molar
mg	Milligramm
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure
neo	Neomycinphosphotransferase-cDNA
NES	Kern-Export-Signal
NLS	Kern-Lokalisationssignal
NP40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
nt	Nukleotid
N-Terminus	Amino-Terminus
NTMT	NaCl/Tris/ MgCl ₂ /Tween 20
NURF	<u>N</u> ukleosomen- <u>R</u> emodelling- <u>F</u> aktor
OD	Optische Dichte
ORF	<u>O</u> pen <u>R</u> eadng <u>F</u> rame
P	Tage nach der Geburt (postnatales Entwicklungsstadium)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBT	PBS/Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PHD	<u>P</u> lant <u>h</u> omeo <u>d</u> omain
pmol	Pikomol
5'-RACE	<u>5'</u> - <u>R</u> apid <u>A</u> mplification of <u>c</u> DNA <u>e</u> nds

RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	NaCl/Na-citrat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung/Tween 20
TE	Tris/EDTA-Puffer
TNT	Tris/NaCl/Tween 20
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TS-Zellen	Trophoblast-Stammzellen
U	Units
u.a.	und andere
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel
β -Gal	β -Galaktosidase
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

Danksagungen

Als erstens möchte ich mich bei meinem Mentor Prof. Dr. Hans-Henning Arnold für die Bereitstellung des interessanten Themas für diese Dissertation sowie die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Daneben bedanke ich mich bei Prof. Dr. Martin Korte und Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel für die Begutachtung meiner Arbeit und die Teilnahme an der Prüfungskommission bedanken.

Großer Dank gilt Dr. Franz Vauti für seine langjährige Unterstützung und die Betreuung meiner Arbeit.

Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, für viele fachliche Ratschläge und besonders für die kollegiale Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei meinen Laborkollegen Blair Prochnow, Nicole Meyer, Suresh Kumar Ramasamy, Elke Freese, Mandy Reichenbach, Christine Deller, Fabian Garreis, Dörte Seider Friederike Kruse, Annika Krause, Monika Giesen, Sieglinde Düerkop und Stefanie Willenzon bedanken.

Ebenso gilt mein Dank sämtlichen Mitarbeitern der Abteilung Zell- und Molekularbiologie des Instituts für Biochemie und Biotechnologie, insbesondere Frau Charlotte Klaue für die Hilfe bei Vertragsangelegenheiten.

Auch bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Achim Gossler und bei Dr. Sebastian Arnold für die Bereitstellung einiger Plasmide und die fachliche Beratung.

Als letztes möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir den Weg bis hier hin ermöglicht und mich auf diesem Weg immer unterstützt hat.

Danke !

Lebenslauf

von

Tobias Goller

23.10.1974	geboren in Hildesheim
1978-1981	Katholischer Kindergarten Lamspringe
1981-1985	Grundschule Bockenem
1985-1987	St. Augustinus-Schule Hildesheim
1987-4.7.1994	Bischöfliches Gymnasium Josephinum zu Hildesheim Erwerb des Abiturs
17.11.1994- 16.2.1996	Zivildienst bei der Lebenshilfe GmbH in Lamspringe
1.10.1996- 28.2.2002	Studium der Biologie an der Technischen Universität Carolo Wilhelmina zu Braunschweig Erwerb des Diploms in Biologie Titel der Diplomarbeit: <i>Expressionsanalyse eines neuen Mausgens, das durch Gene Trap- Insertion identifiziert wurde</i>
seit 1.3.2002	Wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung Zell- und Molekularbiologie des Instituts für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Carolo Wilhelmina zu Braunschweig

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikation

Vauti F., Goller T., Beine R., Becker L., Klopstock T., Hölter S.M., Wurst W., Fuchs H., Gailus-Durner V., Hrabe de Angelis M., Arnold H.H.:

The mouse *Trm1-like* gene is expressed in neural tissues and plays a role in motor coordination and exploratory behaviour. *Gene* (2007) Artikel im Druck

Tagungsbeiträge

Vauti F., Ramasamy S.K., Goller T., Beine R., Prochnow B., Meyer N., Ruiz P., Arnold H.H.:

Establishment of mutant animal models for human diseases on the basis of a gene trap approach in mouse embryonic stem cells. (Poster) German Human Genome Meeting, Braunschweig (2001).

Goller T., Suresh Kumar R., Ruiz P., Arnold H.H., Vauti F.:

The mouse ortholog of the human FAC1 gene: Molecular and functional analysis of a novel gene trap mouse line. (Poster) 17th International Mouse Genome Conference, Braunschweig (2003).